

SIDNEY ALCÂNTARA PEREIRA

ESTUDOS TRANSLACIONAIS DE NOVOS FATORES ENVOLVIDOS NO  
DESENVOLVIMENTO E REGULAÇÃO DO EIXO REPRODUTIVO: OSR1 (*ODD-  
SKIPPED RELATED 1*) E MKRN3 (*MAKORIN RING FINGER PROTEIN 3*)

BRASÍLIA, DF

2018



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

SIDNEY ALCÂNTARA PEREIRA

ESTUDOS TRANSLACIONAIS DE NOVOS FATORES ENVOLVIDOS NO  
DESENVOLVIMENTO E REGULAÇÃO DO EIXO REPRODUTIVO: *OSR1 (ODD-  
SKIPPED RELATED 1)* E *MKRN3 (MAKORIN RING FINGER PROTEIN 3)*

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutor em  
Ciências da Saúde

Orientadora: Adriana Lofrano Alves Porto

Co-orientadora: Michella Soares Coêlho

BRASÍLIA, DF

2018

Dedico esse trabalho aos meus pais Selma e Ronaldo, pelo exemplo de força e perseverança, por nunca me desampararem mesmo quando precisavam de mais amparo do que eu, e pela família onde sempre encontro amor e carinho. Vocês são meu porto seguro!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, a Deusa, a Energia da Vida, ao Holy, ao Amor...por trilhar tantos caminhos, conhecer tantas pessoas com suas maravilhosas diferenças e viver experiências que sempre me fizeram crescer, amar, entender o quão grande é o universo e o quão pequeno somos nós, e que acima de tudo me ensinaram a ser grato. Obrigado por tudo que pude viver e por todos os caminhos que se abrirão para eu ser grato muitas outras vezes.

Aos meus queridos pais Selma e Ronaldo, que me deram todo o suporte de que sempre precisei, mas que acima de tudo me amaram com o mais puro e sublime amor. Obrigado por serem exemplos de seres humanos, que mesmo com seus defeitos e erros, sempre respeitaram e ajudaram o próximo e me ensinaram a trilhar os caminhos da amizade e amor. Aprendi com vocês que a sabedoria não está nos títulos de doutores, mas na simplicidade de um animal ou de uma planta que crescem e dão seus frutos. Amo vocês!

Aos meus avós: Felizarda (*in memorian*), Adélia (*in memorian*), José (*in memorian*) e Adenor (*in memorian*) por serem exemplos de maturidade e experiência e por todo amor e cuidado.

Aos meus tios: Izabel (*in memorian*), Fabrício, Beto, Cida, Almira, Sônia, Luzemar e Suelena, pela ajuda financeira, por me acolherem em suas casas e por todo seu amor.

A todos os meus primos. Pela amizade e carinho ao longo da vida.

À minha prima Eduarda em especial, que sempre foi minha irmã, minha confidente, meu refúgio familiar e que sempre me apoiou e entendeu com um sorriso nos lábios. Admiro-te prima por toda a sua sinceridade e espontaneidade, não existe pessoa tão cheia de luz, pronta para encantar esse mundo quanto você minha querida prima.

Ao meu amigo Danilo, que mesmo de longe participou de cada momento que eu vivi, sempre me ouvindo e não deixando de dar sua opinião de Testemunha que é. Admiro-te meu amigo por toda sua criatividade. Não existe pessoa tão cheia de habilidades e sede por conhecimento quanto o Dan.

À minha amiga Dani, por sempre estar pronta para me ouvir, dar maravilhosos conselhos e por compartilhar meus devaneios e filosofias. Admiro-te Dani por sua força e perseverança. Não existe pessoa tão batalhadora quanto a Daniucha.

À minha amiga Carol que, por tanto tempo estar ao meu lado, por me compreender como ninguém e por toda a fidelidade e confiança. Admiro-te Carolzinha por você ser uma pessoa que com tanta facilidade conquista a amizade do próximo. Não existe pessoa tão espontânea e cativante quanto a Carolzinha.

Ao meu amigo Luís, por tanto cuidado e amor, por ter me apresentado pessoas maravilhosas (Neidinha, Luís pai e Lolo) que se tornaram minha família em Brasília. Obrigado meu amigo por ser um exemplo de caráter, amizade e carinho. Não existe pessoa tão especial quanto você, em todos os sentidos. Te amo e não poderia ser diferente.

Ao meu amigo Douglas, por ser meu irmão, por ter crescido ao meu lado e ter dividido os momentos mais importantes da minha vida. Não existe pessoa mais rara e de coração tão precioso quanto o seu. Obrigado meu amigo por tudo, não tem como especificar, foi uma vida inteira.

Ao meu amigo Murilo, por todo o suporte e amizade. Não existe pessoa mais altruísta do que você Muri.

Às minhas amigas Carol, Cinthia, Fernandinha e Bruninha, por dividirem momentos tão divertidos e outros difíceis e por serem meu suporte nessa nossa louca jornada da pós graduação.

Aos meus amigos e companheiros de luta do Farmol: Bel, Carol Lourenço, Simone, Mariella, Gleice, Janice, Luciana, Nady, Sarah, Henrique, Isadorinha, Hanna, Kaian, Dani, Laíza, Rilva, Luciano e todos aqueles que passaram por esse maravilhoso laboratório e que de alguma forma modificaram minha vida.

Aos amigos do Laboratório de Histopatologia Bucal: Ana Elizia, Dani Fortunato e Gabriel, pela força e amizade durante nossa caminhada pelo doutorado.

Aos meus queridos amigos e família de Boston: Luciana, Fabrício, Duda, Tia, Thalitinha, Dona Sílvia e Marcelo. Obrigado por serem minha família americana e por termos dividido tantos momentos maravilhosos em Boston. E não poderia esquecer do Lex e da Pituchinha.

To my dear ones Lydie, Rajae and Caroline. Thank you so much for all friendship, support in the difficult times and for we having lived such fun times.

To the professors Ursula B. Kaiser, Rona Carroll, Victor Navarro and Ana Paula Abreu for the great opportunity of participate of their research group at Harvard Medical School and of their projects. Thank so much for all support, I have learned a lot with you.

À minha querida orientadora Adriana, por ser minha inspiração. Obrigado por todas as oportunidades e caminhos que você abriu em minha vida. Não existe pessoa mais doce, mesmo que a vida tenha sido tão dura com você. Obrigado por ser um exemplo de pesquisadora, mais acima de tudo por ser um exemplo humano de caráter, perseverança e compreensão ao próximo. Obrigado por ter fé em mim!

À minha querida co-orientadora e amiga Michella, por ter acreditado tanto em mim e aberto tantas oportunidades para a minha formação. Obrigado Michella por todas as conversas e conselhos. Me inspiro muito em você e no seu amor pela ciência. Não existe pessoa mais cautelosa e cuidadosa quanto você. Obrigado por todo carinho e cuidado de mãe.

Ao professor Francisco, pelo o grande exemplo de liderança. Obrigado por todo apoio dado quando precisei. Me inspiro muito em você professor Francisco e em como você tem fé nas pessoas.

A todos os professores da FS: Carine, Angélica, Eliete, Djane, Fátima, Marie Luiz Simeoni, Henrique e Guilherme, que de alguma forma participaram e contribuíram para minha formação.

À Secretaria de Pós-graduação em Ciências da Saúde e às instituições de fomento: CNPq e CAPES, pelo auxílio financeiro no desenvolvimento dos projetos de doutorado e doutorado sanduíche; e FAPDF, pelo auxílio financeiro para participação em congressos e realização de visita técnica.

No pouco que vivi, aprendi que é preciso ter fé nas pessoas e reconhecer a fé delas  
em você...

## LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO I

<b>Figura 1:</b> Aparelho reprodutivo feminino (ARF), organização e diferenciação endometrial e ductos de Muller (DMs).....	18
<b>Figura 2:</b> Diferenciação sexual dos tratos reprodutivos maculino e feminino. ....	19
<b>Figura 3:</b> Formação de ductos de Müller (DMs). ....	21
<b>Figura 4:</b> Genes envolvidos no desenvolvimento dos dutos de Müller (DMs). ....	23

## LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO II

<b>Figura 5:</b> O eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG) em mamíferos. ....	66
<b>Figura 6:</b> Principais populações hipotalâmicas de neurônios de kisspeptina em roedores. ....	68
<b>Figura 7:</b> Influência da neuroquinina B (Nkb) e dinorfina A (Dyn) sobre a secreção de kisspeptina e de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH).....	70
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática dos possíveis mecanismos de ação dos neurônios de RF-amide related peptides (Rfrps) sobre a neurofisiologia de camundongos.....	72
<b>Figura 9:</b> Mutações na proteína MKRN3 identificadas em pacientes com puberdade precoce central (CPP). ....	74
<b>Figura 10:</b> Representação esquemática do possível mecanismo de ação do Makorin RING-finger protein 3 (MKRN3). ....	76
<b>Figura 11:</b> Esteroidogênese nas células de Leydig (CL). ....	81



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO I: ODD- SKIPPED RELATED 1 (OSR1/OSR1): NOVO FATOR ENVOLVIDO NO DESENVOLVIMENTO E FUNÇÃO DO TRATO REPRODUTIVO FEMININO</b> .....	<b>14</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1 APARELHO REPRODUTIVO FEMININO (ARF).....	17
2.2 FORMAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DOS DUCTOS DE MÜLLER.....	18
2.3 AMADURECIMENTO DOS DUCTOS DE MÜLLER.....	23
2.4 USO DE ABORDAGENS GENÉTICAS NO ENTENDIMENTO DO DESENVOLVIMENTO E DIFERENCIAÇÃO DO ARF .....	24
<b>3 MANUSCRITO 1</b> .....	<b>29</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>57</b>
<b>5 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>58</b>
<b>CAPÍTULO II: ESTUDO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE MAKORIN RING FINGER 3 (MKRN3) NAS GÔNADAS DE CAMUNDONGOS</b> .....	<b>62</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>62</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>65</b>
2.1 CONTROLE NEUROENDÓCRINO DO PROCESSO REPRODUTIVO.....	65
2.1.1 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas (HPG) .....	65
2.1.2 Kisspeptina, Neuroquinina B (NKB) e Dinorfina A (DYN).....	66
2.1.3 Hormônio inibidor de gonadotrofinas (GnIH)/RFamide-related peptide 3 (RFRP3) .....	71
2.1.4 Makorin RING-finger protein 3 (MKRN3).....	73
2.2 SÍNTESE DE NEUROPEPTÍDEOS PELAS GÔNADAS .....	76
2.2.1 Localização e expressão de neuropeptídeos no testículo.....	77
2.2.2 Localização e expressão de neuropeptídeos no ovário .....	78
2.2.3 Efeitos de neuropeptídios na função gonadal .....	79
2.3 GONADOTROFINAS E OS COMPARTIMENTOS TESTICULARES.....	80
<b>3 MANUSCRITO 2</b> .....	<b>83</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>107</b>
<b>5 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>108</b>

## RESUMO

**CAPÍTULO I:** Neste trabalho, foi estudada uma família na qual 3 irmãs apresentaram amenorréia primária por provável alteração na formação dos ductos de Müller (DMs), caracterizada por hipoplasia uterina, endométrio não responsivo a estrógenos e gestações tubárias. Através de sequenciamento exômico amplo seguido por análise genética abrangente foi identificado uma mutação em homozigose no gene *Odd-skipped related 1* gene (*OSR1*), p.V108F. Para esclarecer os efeitos do *Osr1* no desenvolvimento dos DMs, foram investigados o padrão de expressão pré-natal e pós-natal de *Osr1/Osr1* nos DMs e endométrio, respectivamente, e se a deleção de *Osr1* poderia afetar o desenvolvimento dos DMs, através do uso de camundongos geneticamente modificados. Foi demonstrado que o *Osr1* é expresso nos DMs e nos ductos de Wolff (DWs) de embriões com 13,5 dias de gestação (E13,5). Curiosamente, os DMs não foram observados no lado esquerdo e estavam truncados rostralmente no lado direito de E13,5 *Osr1*<sup>-/-</sup> nocautes. Após o nascimento, o *Osr1* é expresso no útero de camundongos selvagens ao longo de todo o desenvolvimento, com expressão mais acentuada em dois períodos distintos, aos 14 dias pós natais (PND14) e PND28-PND35, que correspondem à adenogênese endometrial e o início da puberdade, respectivamente. No útero adulto, a proteína *Osr1* é expressa principalmente nas células epiteliais luminiais e glandulares do endométrio, como também no epitélio dos ovidutos, sendo observada menor expressão no estroma endometrial. Através de uma abordagem translacional, demonstramos que *OSR1* é um novo candidato entre os fatores moleculares que modulam a formação e diferenciação de estruturas derivadas dos DMs.

**CAPÍTULO II:** No presente estudo, foram investigados comparativamente o padrão de expressão de *Mkrn3* no hipotálamo com as gônadas masculinas e femininas. Além disso, foram abordados o padrão de expressão temporo-espacial desta proteína durante o desenvolvimento sexual, e se ela é regulada nos compartimentos testiculares pelas gonadotrofinas. A quantificação por qPCR mostrou que os níveis de mRNA de *Mkrn3* foram detectados em testículos e ovários de camundongos selvagens em todas as idades avaliadas, entretanto, o padrão de expressão de *Mkrn3* foi dimórfico entre gônadas masculinas e femininas ao longo da vida. Curiosamente, a expressão de *Mkrn3* foi maior entre PND28 e PND35 nos testículos, enquanto que nos ovários atingiu os menores níveis durante o mesmo

período. Adicionalmente, a coloração de X-gal em cortes de testículos provenientes de camundongos *Mkrn3-LacZ* adultos mostrou que o *Mkrn3* é principalmente localizado no compartimento intersticial, especificamente em células de Leydig, mas também foi detectado nos túbulos seminíferos com menor expressão. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o RNAm de *Mkrn3* aumentou em culturas primárias de células de Leydig tratadas com hCG. Além disso, a administração aguda de agonista de GnRH em camundongos selvagens adultos aumentou a expressão de *Mkrn3* nos testículos, enquanto a inibição do eixo HPG pela mesma substância administrada de forma crônica levou ao efeito oposto. Por fim, no grupo de animais que receberam injeção de hCG após a inibição do eixo HPG, foi observado aumento na expressão de *Mkrn3*. Em conjunto, análises de expressão durante o desenvolvimento e estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que o *Mkrn3* é produzido nos testículos, predominantemente nas células de Leydig, e que sua expressão de RNAm aumenta após a puberdade e é responsiva à ativação do receptor LH/hCG.

**Palavras-chave:** OSR1; aparelho reprodutivo feminino; ductos de Muller; MKRN3; gônadas; expressão gênica.

## ABSTRACT

**CHAPTER I:** We present a family in which three sisters had a Mullerian Duct (MD) anomaly characterized by uterine hypoplasia, estrogen-unresponsive endometrium, primary amenorrhea, but spontaneous tubal pregnancies. Whole Exome Sequencing followed by comprehensive genetic analysis identified a novel homozygous variant in *Odd-skipped related 1* gene (*OSR1*), p.V108F. To clarify the effects of *Osr1* on MD development, we investigated prenatal and postnatal expression patterns of *Osr1/Osr1* in the MDs and endometrium, respectively, and whether *Osr1* deletion affects MD development, using genetically engineered mice. We showed that *Osr1* is expressed in the MDs and Wolffian ducts (WDs) of E13.5 embryos. Interestingly, MDs are absent on the left side, and rostrally truncated on the right side of E13.5 *Osr1*<sup>-/-</sup> knockouts. *Osr1* is expressed lifelong in WT mice uterus with two distinct peaks at PND14 and PND28-PND35, which correspond to endometrial adenogenesis and puberty initiation, respectively. *Osr1* is expressed mainly in endometrial luminal and glandular epithelial cells, and less in stroma, with a high expression in oviduct epithelium. This pair-rule gene plays critical roles on embryonic patterning and tissue morphogenesis. Through a translational approach, we demonstrated that *OSR1* is a novel candidate among the molecular factors that modulate the formation and differentiation of MD-derived structures.

**CHAPTER II:** In the present study, we comparatively investigated the behavior of *Mkrn3* expression in the hypothalamus *versus* male and female gonads. We also addressed the temporo-spatial expression pattern of this protein during sexual development, and whether it is regulated in the functional testicular compartments by gonadotropins. Quantification by qPCR showed that *Mkrn3* mRNA levels was detected in testes and ovaries of wild-type mice at all ages evaluated, however, the pattern of *Mkrn3* expression across lifespan differed between male and female gonads. Interestingly, *Mkrn3* expression was highest by PN28 to PN35 in the testes, whereas it reached the nadir at the same postnatal ages in the ovaries. Moreover, X-gal staining of testes sections from adult *Mkrn3*-LacZ reporter mice showed that *Mkrn3* is expressed mainly in the interstitial compartment, specifically in Leydig cells, but was also mildly detected in the seminiferous tubules. *In vitro* and *in vivo* studies demonstrated that the *Mkrn3* mRNA levels increased in hCG-treated Leydig cells primary cultures. Furthermore, the acute administration of LHRH agonist in adult wild-type mice increased *Mkrn3*

expression in testes and the inhibition of the HPG axis, by chronic administration of LHRH agonist, leads to the opposite effect. Finally, the rescue of *Mkrn3* expression was observed in the group of animals that received hCG injection after completing the HPG downregulation phase. Taken together, our developmental expression analyses, *in vitro* and *in vivo* studies showed that *Mkrn3* is produced in the testis, predominantly in the Leydig cells, and that its mRNA expression increases after puberty and is responsive to LH/hCG receptor activation.

**Keywords:** OSR1; female reproductive tract; Mullerian duct; MKRN3; gonads; gene expression.

## **CAPÍTULO I: *ODD-SKIPPED RELATED 1 (OSR1/OSR1)*: NOVO FATOR ENVOLVIDO NO DESENVOLVIMENTO E FUNÇÃO DO TRATO REPRODUTIVO FEMININO**

### **1 INTRODUÇÃO**

O aparelho reprodutivo feminino (ARF), composto pelo útero, ovidutos, endométrio e vagina, sofre processos biológicos críticos, os quais podem resultar em gestações bem sucedidas ou fracassos reprodutivos, como por exemplo, falhas de implantação ou abortos recorrentes (LAYMAN, 2013). O conhecimento do processo fisiológico de regulação, desenvolvimento e diferenciação do ARF durante a embriogênese e vida adulta reprodutiva ainda é limitado.

Avanços nas técnicas de reprodução assistida muito contribuíram para o sucesso da reprodução em mulheres com infertilidade de diversas etiologias e também em animais diversos, domésticos e selvagens, principalmente para a multiplicação rápida de material genético, preservação de germoplasma e para o aumento da produtividade em inúmeras espécies de importância na cadeia comercial (HANSEN, 2014; AMSTISLAVSKY, et al., 2012; DURRANT, 2009). Nesse sentido, é essencial ampliar o entendimento de doenças de alta prevalência que causam infertilidade e distúrbios na saúde reprodutiva humana e animal, e que resultam em grande impacto biológico.

Muitos mecanismos moleculares que regulam a diferenciação e desenvolvimento do ARF em seres humanos e animais no início da vida embrionária ainda precisam ser compreendidos. Observa-se crescente interesse na investigação de defeitos moleculares que estejam associados a distúrbios na formação do ARF e, conseqüentemente, na patologia da reprodução. A descoberta de novas vias que controlam as ações de hormônios esteroides sexuais, bem como a proliferação e a diferenciação de células do ARF tem evidenciado, de forma crescente, que tanto alterações uterinas pré-natais quanto a diferenciação do endométrio pós-natal são reguladas por um grande número de moléculas sinalizadoras, receptores, fatores de transcrição e coreguladores (CHA et al., 2012).

Neste contexto, os ductos de Muller (DM), estruturas primordiais e precursoras dos ovidutos, útero, cérvix e vagina, constituem alvo dos estudos recentes, uma vez que alterações na formação e diferenciação dessas estruturas

resultam em malformações do ARF. Adicionalmente, distúrbios nos processos de regulação da diferenciação pós-natal das estruturas derivadas dos DM também conduzem a infertilidade, por mecanismos ainda não completamente compreendidos (MASSÉ et al., 2009).

As anomalias mulerianas compreendem um grupo heterogêneo de defeitos de desenvolvimento que afetam a anatomia e a função da ARF, incluindo desde anormalidades uterinas menores, como útero septado e bicorno, até a ausência congênita de útero e vagina (GRIMBIZIS et al., 2013; JACQUINET et al., 2016). Uma das mais graves condições no espectro das anomalias mulerianas em humanos é conhecida como síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) ou agenesia útero-vaginal, sendo a segunda causa mais comum de amenorréia primária. Aproximadamente 1 em 4.500 nascidos vivos tem MRKH, representando 15% das mulheres com amenorreia primária. Casos raros em agrupamentos familiares e a associação com outros defeitos congênitos, como malformações renais ou esqueléticas, têm direcionado a busca da base genética da doença (MASSÉ et al., 2009; GRIMBIZIS et al., 2013). Ainda assim, o mecanismo molecular da maioria dessas condições ainda não foi identificado.

No presente trabalho, foi estudada uma família em que três irmãs, nascidas de um casamento consanguíneo, apresentaram-se com amenorreia primária, desenvolvimento completo de caracteres sexuais secundários e uma anomalia muleriana única caracterizada por hipoplasia uterina com endométrio fino e não responsivo a estrógenos e gestações ectópicas espontâneas. A ocorrência hereditária dessa condição e sua caracterização e particularidade clínica levantou a hipótese de um distúrbio genético da formação do aparelho reprodutor feminino. Através de sequenciamento exômico amplo seguido por análise genética abrangente, *Odd-skipped related 1 (OSR1)* surgiu como gene candidato para o desenvolvimento dos DM.

O OSR1 é um fator de transcrição do tipo *zinc-finger* que tem papel na diferenciação do mesoderma intermediário (rim e coração) já bem definido em diversos mamíferos, porém com papel funcional ainda pouco conhecido em seres humanos (WANG et al., 2005; LAN et al., 2011). Estudos recentes sugerem que o gene *Osr1* tem associação determinante com vias de sinalização primordiais para a diferenciação do mesoderma intermediário e desenvolvimento das estruturas urogenitais (MULLEN E BEHRINGHER, 2014).

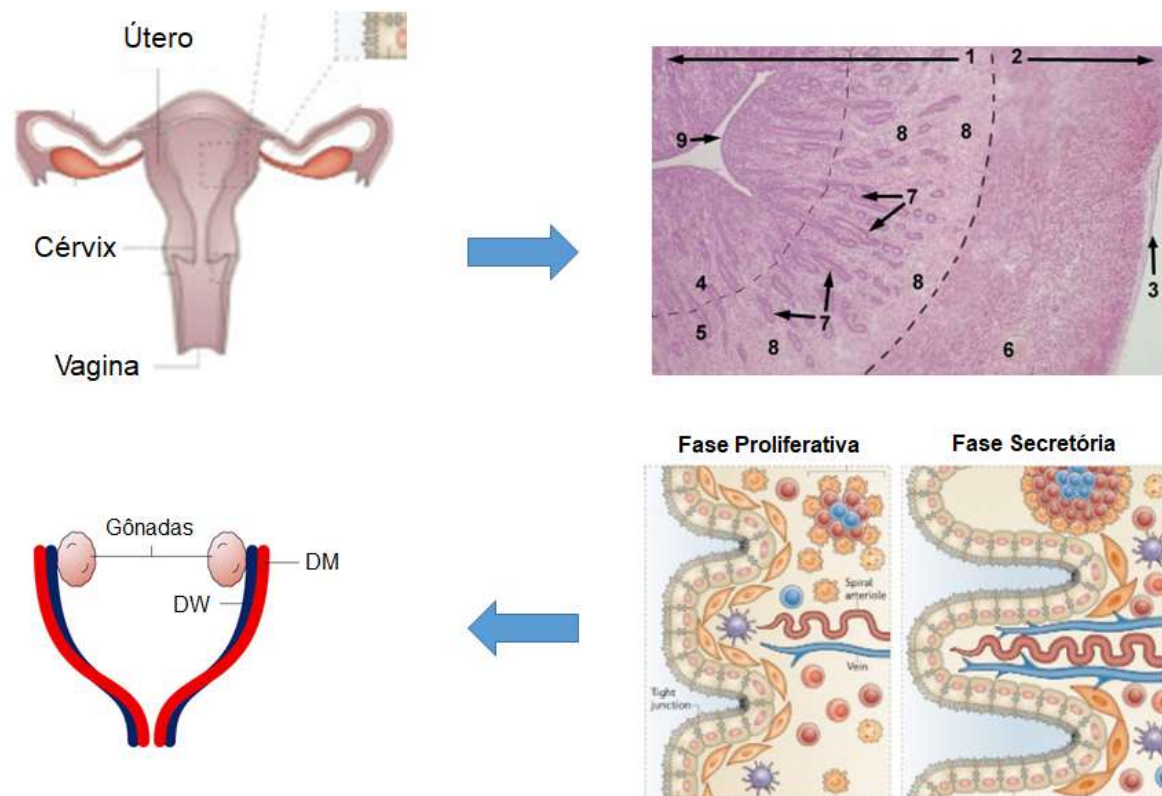
Nesse sentido, considerando o conhecimento recente sobre as vias no desenvolvimento embrionário das estruturas urogenitais e diante do papel do *Osr1* na diferenciação precoce do mesoderma intermediário, a hipótese aqui proposta é que o gene *Osr1* poderia exercer papel regulatório na diferenciação dos ductos de Muller no período pré-natal, bem como possivelmente atuar nos mecanismos envolvidos na diferenciação pós-natal do endométrio, durante os processos de receptividade endometrial, implantação embrionária e decidualização.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 APARELHO REPRODUTIVO FEMININO (ARF)

O aparelho reprodutivo feminino (ARF) é composto pelos ovidutos, útero, cérvix e vagina, e constitui o sítio de fecundação, desenvolvimento embrionário e fetal e expulsão do feto. Durante as diferentes fases do ciclo estral, o ARF sofre diversas transformações, principalmente a nível endometrial. O endométrio humano é um tecido altamente dinâmico, o qual é eliminado, reparado, regenerado e remodelado ciclicamente. A organização histológica do endométrio uterino adulto consiste em um epitélio luminal colunar simples, sustentado por células estromais e glândulas endometriais. O endométrio é envolvido em toda sua extensão por uma camada muscular uterina conhecida como miométrio. As glândulas endometriais podem se diferenciar, sob estimulação de estrogênio e progesterona, em glândulas secretoras, em preparação para implantação do embrião. O desenvolvimento de todo o ARF começa no período pré-natal, com formação e diferenciação dos ductos de Muller. Por outro lado, o trato genital masculino é originado pelos ductos de Wolf (Figura 1) (MASSÉ et al., 2009; MULLEN E BEHRINGHER, 2014).



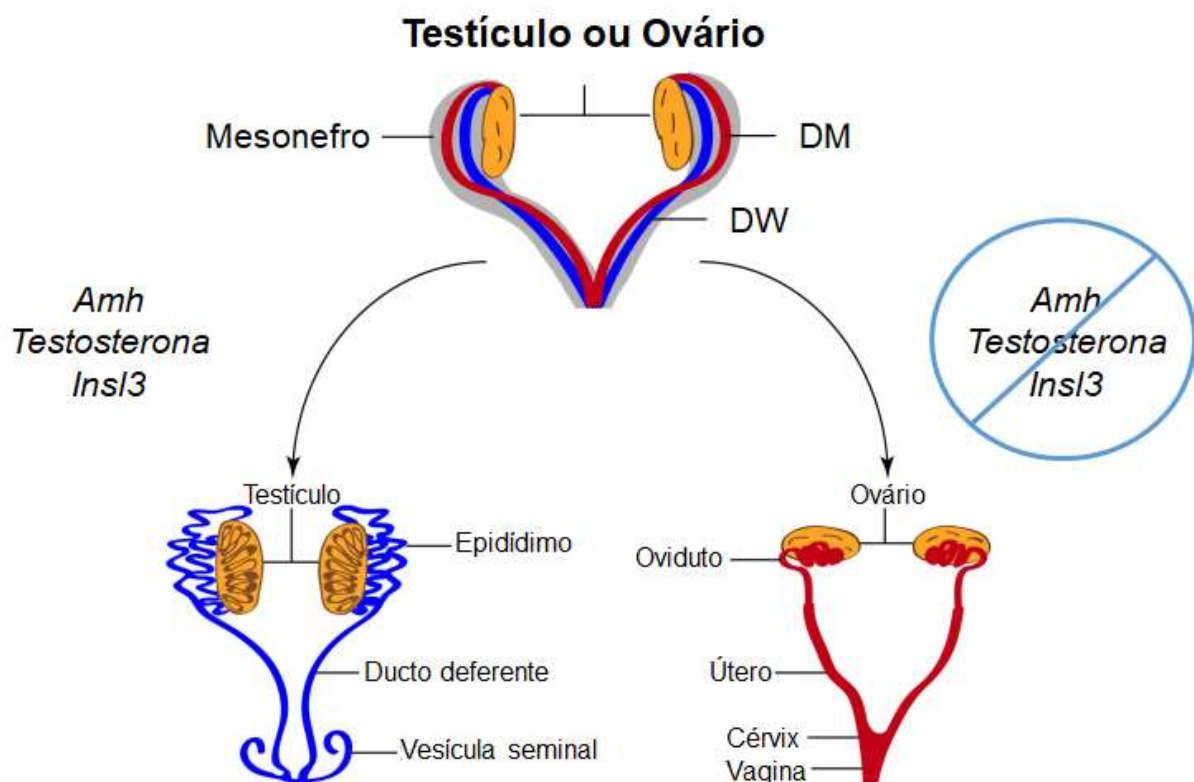
**Figura 1: Aparelho reprodutivo feminino (ARF), organização e diferenciação endometrial e ductos de Muller (DMs).** O ARF é composto pelos ovidutos, útero, cérvix e vagina. A organização histológica do endométrio uterino adulto consiste em um epitélio luminal colunar simples (9), sustentado por células estromais (1,4,5 e 8) e glândulas endometriais (7). O endométrio é envolvido em toda sua extensão por uma camada muscular uterina conhecida como miométrio (2, 3 e 6). As glândulas endometriais podem se diferenciar, sob estimulação de estrogênio e progesterona, em glândulas secretoras. O desenvolvimento de todo o ARF começa no período pré-natal, com formação e diferenciação dos DMs.

## 2.2 FORMAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DOS DUCTOS DE MÜLLER

Ao longo dos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário de mamíferos, os ductos de Wolff (DW) e de Muller (DM) constituem estruturas primordiais, que se desenvolvem no mesoderma intermediário tanto em embriões de sexo genético masculino (46,XY) quanto feminino (46,XX). Essas estruturas, também conhecidas por ductos mesonéfricos e ductos paramesonéfricos, são precursoras dos tratos urogenitais masculino e feminino, respectivamente (MASSÉ et al., 2009).

Após a determinação sexual, os DM regridem nos embriões masculinos, sob efeito do hormônio antimulleriano (AMH), produzido pelas células de Sertoli dos

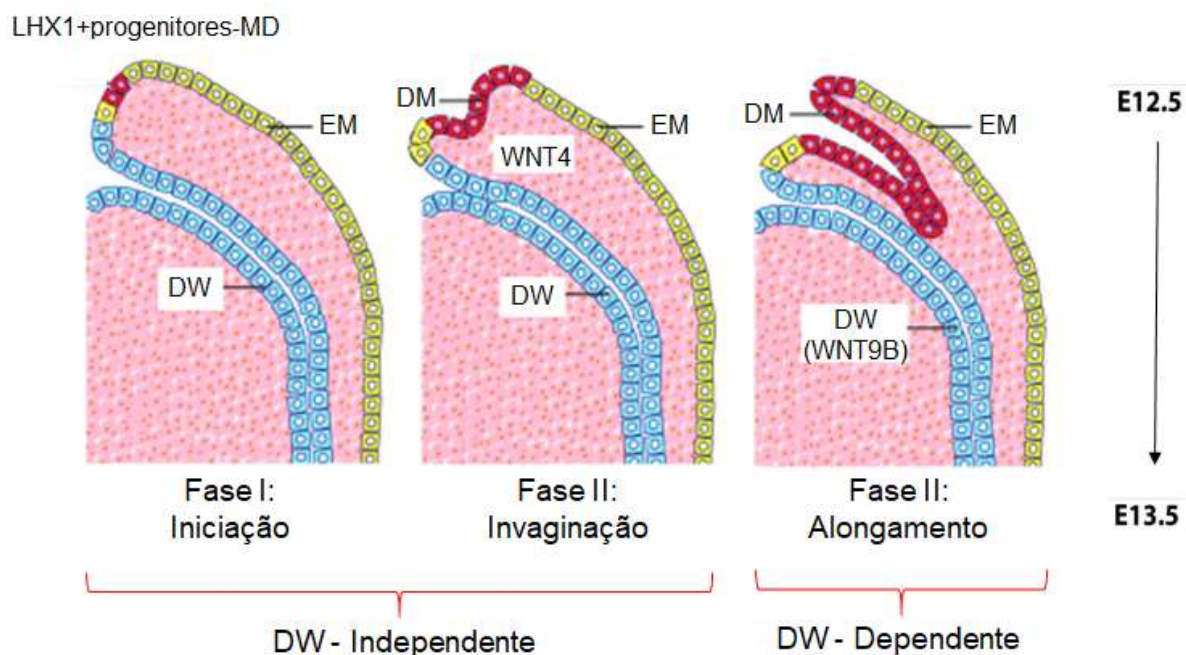
testículos fetais, enquanto os DW diferenciam-se nas estruturas que compõem a o aparelho reprodutor masculino, vasos deferentes, epidídimo e vesículas seminais, sob estímulo da testosterona produzida pelas células de Leydig testiculares. Contrariamente, em embriões femininos, a ausência de atividade de testosterona e AMH resulta em regressão passiva dos DW e ocorre diferenciação e desenvolvimento dos DM, os quais, por sua vez, originam as estruturas do aparelho reprodutor feminino (Figura 2) (MASSÉ et al., 2009).



**Figura 2: Diferenciação sexual dos tratos reprodutivos maculino e feminino.** Os tratos reprodutivos antes da diferenciação sexual são equivalentes e contêm um ducto de Wolff (DW, representado em azul) e um ducto de Müller (DM, representado em vermelho). Hormônios produzidos nos testículos fetais, hormônio anti-Mülleriano (Amh), testosterona e insulina-like 3 (InsI3), permitem a regressão do DM, diferenciação do DW no trato genital masculino e descida testicular, respectivamente. Nas mulheres, a falta de Amh, testosterona e InsI3 neste período de desenvolvimento permite a diferenciação do DM no trato reprodutivo feminino, degeneração passiva do DW e manutenção dos ovários na posição abdominal, respectivamente. O DW diferencia-se no trato reprodutivo masculino que consiste em ductos deferentes, epidídimos e vesículas seminais. O DM desenvolve-se no trato reprodutivo feminino, que consiste nos ovidutos, no útero, cérvix e na parte superior da vagina. Adaptado de MULLEN E BEHRINGER, 2014.

A origem embrionária dos ductos de Muller foi um assunto controverso por vários anos. Atualmente, sabe-se que a formação dos DM é iniciada na parte anterior do mesoderma intermediário do embrião de mamíferos, com a formação de um espessamento em forma de placa de um pequeno grupo de células epiteliais localizadas na porção mais alta (rostral) do mesonefro. Os mecanismos que regulam a diferenciação dessas células precursoras em DM ainda são desconhecidos, mas a expressão do fator de transcrição *Lhx1*, pertencente à classe de homeodomínios LIM (*lin-11*, *Isl1* e *mec-3*), parece ser essencial para a iniciação da formação dos DM. Na etapa seguinte, ocorre invaginação das células especificadas do epitélio mesonéfrico (celômico) em direção caudal ao DW. A expressão do gene *Wnt4* no epitélio celômico ou no mesênquima do mesonefro parece necessária para sinalizar as células progenitoras do DM a iniciarem a invaginação. A falta da sinalização por *Wnt4* não altera a expressão de *Lhx1* nas células precursoras do DM, porém impede o processo de invaginação, comprometendo assim a formação dos DM (MULLEN E BEHRRINGHER, 2014).

Na próxima etapa, o alongamento, inicia-se quando as células especificadas do DM tocam os DW e assim se alongam em contato íntimo com esses, até se juntarem no seio urogenital (MASSÉ et al., 2009). A origem das células Mullerianas ao longo do ducto ainda não está completamente estabelecida. Alguns autores sugeriram que os DW contribuem para a formação dos ductos de Müller (DOHR et al., 1987); alternativamente, é possível que os DW agem apenas como guias para o alongamento dos DM (DOHR et al., 1987). Atualmente, acredita-se que a origem das células epiteliais do DM seja uma população do epitélio mesonéfrico provavelmente localizada na transição entre o pronefro e o mesonefro. Estudos recentes realizados com cultura de células urogenitais de camundongos (ORVIS E BEHRRINGHER, 2007) e em linhagem de células celômicas (GUIOLI et al., 2007) descartaram a hipótese do envolvimento de células provenientes do DW como precursoras para o surgimento de células müllerianas (Figura 3).

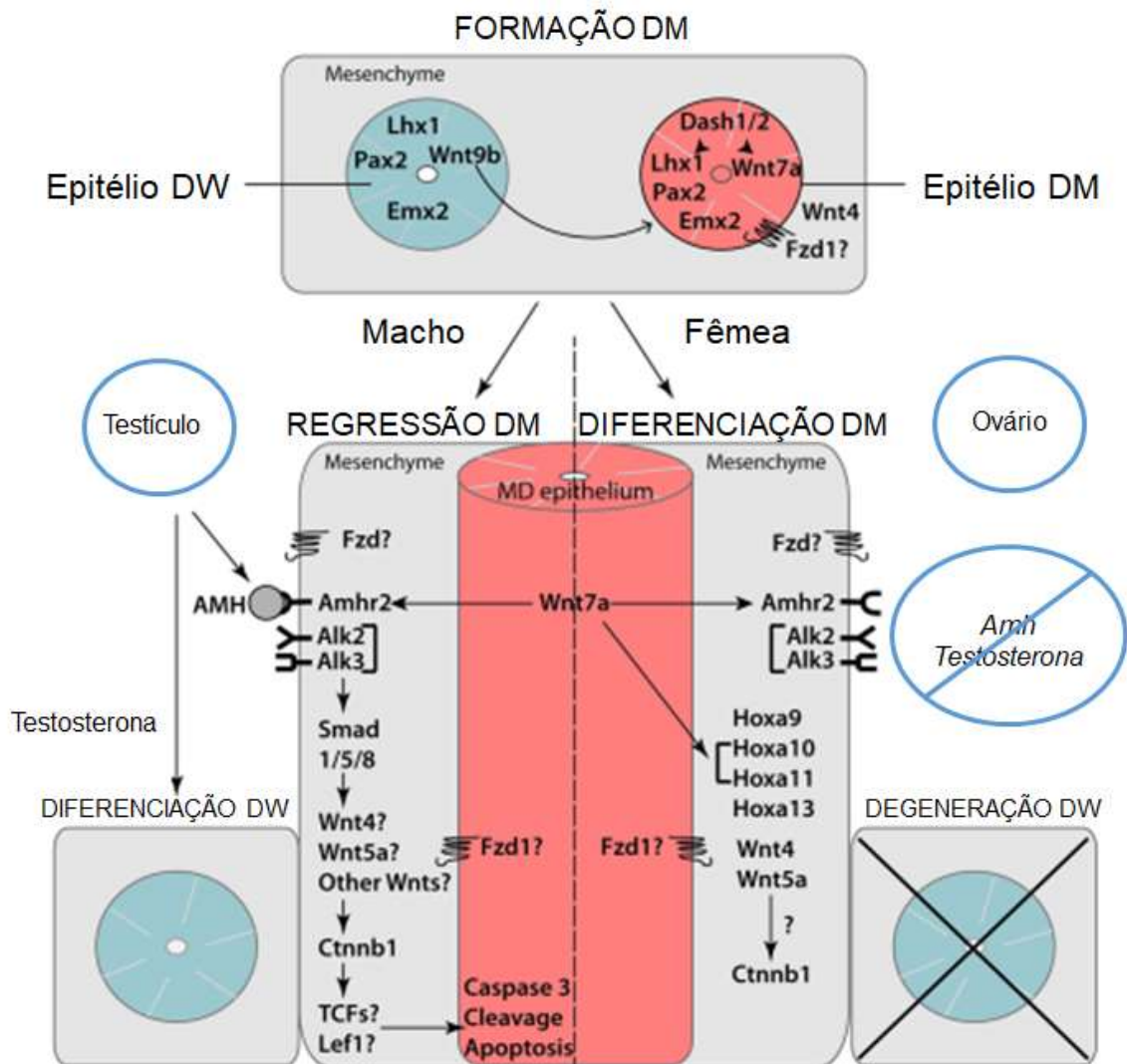


**Figura 3: Formação de ductos de Müller (DMs).** (A) A formação dos DMs (representados em vermelho) ocorre em três fases: iniciação, invaginação e alongamento. Fase I (Iniciação); As células progenitoras dos DMs no epitélio mesonéfrico (representadas em amarelo) são especificadas e começam a expressar LHX1. Fase II (invaginação): Em resposta à sinalização do WNT4 no mesênquima, as células progenitoras LHX1 + DMs invaginam caudalmente no mesonefro em direção aos ductos de Wolf (DWs) (representados em azul). Fase III (Alongamento): A ponta do DMs encontra os DWs e se alongam caudalmente próximo à estrutura dos DWs e sinalização de WNT9B. Adaptado de MULLEN E BEHRINGER, 2014.

A formação do DM, após iniciação do “destino” de um pequeno grupo de células precursoras na parte rostral do mesonefro, segue com a invaginação do epitélio colêmico e com o alongamento do ducto até o seio urogenital, em íntimo contato com os DW. Em camundongos, todo esse processo ocorre entre os dias 12,5 (E12,5) e 13,5 (E13,5) da vida embrionária. Esses mecanismos dependem da expressão de vários fatores de transcrição e de moléculas de sinalização em série, porém, a inter-relação dos mesmos e os mecanismos de ativação em cascata ainda não são elucidados. Sabe-se que uma série de fatores de transcrição e moléculas de sinalização são necessários para o desenvolvimento do sistema reprodutor feminino, dentre eles, *Lim1*, *Pax2*, *Emx2*, *Wnt4*, *Wnt9b*, *Tcf2*, *Dach1* e *Dach 2*, que parecem ter um papel importante na formação do DM (MASSÉ et al., 2009; MULLEN E BEHRRINGER, 2014; KURITA, 2011).

Após o final da fase de alongamento, as pontas de crescimento dos DM convergem e se unem no seio urogenital (ORVIS E BEHRINGER, 2007). Os túbulos de Müller então se fundem e formam um tubo luminar, o ducto útero-vaginal, que dará origem à parte superior da vagina, do colo do útero e do útero. A região anterior não fundida dos DM diferencia-se nas tubas uterinas e infundíbulo. A morfologia do útero dos mamíferos varia acentuadamente entre as espécies, dependendo da largura da fusão dos ductos. Por exemplo, o útero é duplo na maioria dos roedores, geralmente bicornado em grandes quadrúpedes e simples na maioria dos primatas, incluindo humanos (KOBAYASHI E BEHRINGER 2003).

A correta padronização e diferenciação do DM dependem de uma complexa rede de genes Wnt e Hox. Além disso, sabe-se que os hormônios esteróides também regulam muitos dos genes necessários para a diferenciação adequada do DM durante a organogênese e a idade adulta (Figura 4) (MASSE et al., 2009).



**Figura 4: Genes envolvidos no desenvolvimento dos dutos de Müller (DMs).** Múltiplos fatores e vias de sinalização no mesênquima (representado em cinza) e no epitélio de ambos os ductos (epitélio DW representado em azul; epitélio do DM representado em vermelho) atuam em conjunto para direcionar o desenvolvimento dos DMs. Hormônios e genes são necessários para a formação dos DMs, regressão em homens e diferenciação em mulheres são indicados nesta figura. Adaptado de MULLEN E BEHRINGER, 2014.

### 2.3 AMADURECIMENTO DOS DUCTOS DE MÜLLER

O amadurecimento dos DM ocorre em três etapas: 1) diferenciação do epitélio dos DM em regiões específicas, 2) formação e organização do endométrio e miométrio, 3) adenogênese uterina (MASSÉ et al., 2009).

Primeiramente, o epitélio de camada única adquire diferentes morfologias e cito-arquiteturas ao longo de seu eixo anteroposterior. Esse processo ocorre perinatalmente durante os dias 16-18 de gestação em camundongos, onde o epitélio

uterino é composto por células epiteliais colunares simples, os epitélios do colo posterior e vagina são constituídos por células escamosas estratificadas e o epitélio dos oviductos possui células ciliares e secretoras (KOMATSU E FUJITA 1978; KURITA et al. 2001).

Ao nascimento, o útero de camundongos não possui glândulas endometriais e consiste de um epitélio simples sustentado por um mesênquima indiferenciado. Entre o nascimento e o 5º dia pós-natal ocorre o surgimento de invaginações epiteliais (epitélio do endométrio) e as três camadas de mesênquima são distintamente segregadas em estroma endometrial e miométrio circular interno. A gênese das glândulas endometriais não é observada até P7 e P9 em camundongos e ratos, respectivamente (SPENCER et al., 2012).

O desenvolvimento do trato genital feminino termina com a adenogênese, isto é, a formação de glândulas uterinas e diferenciação funcional. Durante a adenogênese as glândulas uterinas brotam e se estendem do epitélio luminal colunar simples para o estroma endometrial circundante, e a camada longitudinal externa do miométrio se organiza em feixes. Em camundongos, esse processo começa por volta do 10º dia pós-natal e a configuração básica do útero adulto é estabelecida por volta do 15º dia pós-natal (MASSÉ et al., 2009; SPENCER et al., 2012).

#### 2.4 USO DE ABORDAGENS GENÉTICAS NO ENTENDIMENTO DO DESENVOLVIMENTO E DIFERENCIAÇÃO DO ARF

Apesar da importância do sistema reprodutor feminino, relativamente pouco se sabe sobre os mecanismos celulares e moleculares que regulam o desenvolvimento da estrutura que o origina, os DM, e seu desenvolvimento, inclusive no período pós-natal. Alguns genes relacionados à embriogênese dos DM foram descritos por meio do estudo do fenótipo associado a síndromes genéticas complexas que afetam o aparelho reprodutor feminino ou de estudos em camundongos geneticamente modificados (*knockout*) (KOBAYASHI E BEHRRINGER, 2003; MASSÉ et al., 2009). A análise molecular de mecanismos celulares atuantes no desenvolvimento dos DM se torna essencial para elucidar a patogênese molecular dos distúrbios do desenvolvimento do sistema reprodutor feminino.



Os genes da família *Wnt* têm sido descritos como importantes fatores de transcrição e moléculas de sinalização necessárias para o desenvolvimento do sistema reprodutor feminino e formação dos DM, dentre outros tecidos. Dentre eles, *Wnt9b* e *Wnt4*, foram descritos como fatores parácrinos cruciais para a formação dos DM (MASSÉ et al., 2009).

Alguns estudos mostraram que camundongos fêmeas com deleção de *Wnt4* exibiram uma completa ausência de ARF e aparente masculinização dos ovários. Esses achados sugeriram que *Wnt4* é um pré-requisito para a formação dos estágios iniciais do DM (STARK et al., 1994; VAINIO et al., 1999; HEIKKILA et al., 2005; VAN DER HORST et al., 2012). Consistentemente, mutações no gene *Wnt4* foram identificadas em raros casos de mulheres com fenótipo bastante semelhante ao do modelo murino: completa ausência de estruturas derivadas de DM (síndrome de Meyer-Rokitanski-Küster-Hauser) e sinais clínicos de androgenia (BIASON-LAUBER et al., 2004).

O gene *Wnt9b* é expresso em células epiteliais do ducto de Wolff (DW) entre 9,5 e 14,5 dias do período embrionário em camundongos, quando ambos, DW e DM estão presentes. Em embriões *Wnt9b*<sup>-/-</sup> não houve o desaparecimento dos DW e DM, porém o alongamento dos DM foi prejudicado (CARROLL et al., 2005). Esses achados indicam que em camundongos o *Wnt9b* é determinante para o processo de alongamento dos DM (VAN DER HORST et al., 2012).

Outros membros da família *Wnt*, dentre eles, *Wnt7a* e *Wnt5a* têm sido relacionados com mecanismos importantes para a maturação final do ARF, tais como, início da fase glandular no útero, cooperação e sinalização entre as células do estroma e epitélio uterino e diferenciação e maturação endometrial (MASSÉ et al., 2009).

O gene *Wnt7a* é expresso, antes e depois do nascimento, ao longo de todo o oviduto e epitélio do lúmen uterino (MILLER E SASSOON, 1998). Camundongos com *Wnt7a* silenciado apresentaram ausência dos ovidutos ou presença dessas estruturas com características semelhantes à morfologia uterina. Além disso, esses animais demonstraram úteros com acentuada equivalência com a estrutura da vagina, ou seja, com espessamento da musculatura circundante, um estroma relativamente fino, perda de glândulas e um epitélio luminal com um aspecto claro e escamoso (MILLER E SASSOON, 1998; PARR E MCMAHON, 1998). Esses achados indicam que a perda da função do gene *Wnt7a* parece resultar em

alterações no padrão de diferenciação celular nos DM, o que leva à “posteriorização” do trato reprodutivo feminino, isto é, um padrão em que células de um segmento anatômico do ARF se diferenciam anormalmente como células do segmento imediatamente posterior. Esses achados indicam um papel importante desse gene no padrão correto de desenvolvimento e diferenciação segmentar dos DM nos diferentes componentes (segmentos anatômicos) do ARF, a saber: ovidutos, corpo uterino, cérvix e vagina (VAN DER HORST et al., 2012).

Em camundongos normais o gene *Wnt5a* é expresso nas células mesenquimais ao redor dos DM e posteriormente nas mesmas células presentes no útero, cérvix e vagina (MILLER E SASSOON, 1998). Camundongos fêmeas *Wnt5a*<sup>-/-</sup> exibiram tubas uterinas e cornos uterinos anteriores normais, porém perda da estrutura da cérvix posterior e vagina, e cornos uterinos severamente enovelados ou fundidos em sua linha média. Outras investigações mostraram que em camundongos selvagens houve elevada expressão de *Wnt5a* na região do estroma endometrial e que *Wnt5a* e *Wnt7a* parecem agir lado a lado no controle da formação do endométrio (MERICSKAY et al., 2004; VAN DER HORST et al., 2012).

A família de genes homeobox de mamíferos (*Hoxa9*, *Hoxa10*, *Hoxa11* e *Hoxa13*) é necessária para diferenciação e padronização segmentar dos DM. Os genes *Hoxa/HOXA10* demonstraram desempenhar papéis importantes durante o desenvolvimento embrionário do epitélio, estroma e músculo uterino (TAYLOR et al., 1997), enquanto o gene *Hoxa11* está envolvido principalmente na formação de glândulas uterinas e decídua precoce (GENDRON et al., 1997). Além disso, esses fatores também são expressos ciclicamente no endométrio adulto, sob regulação de esteróides sexuais, e podem participar da implantação embrionária (TAYLOR et al., 1997; DAFTARY E TAYLOR, 2006).

Curiosamente, camundongos fêmeas nocautes de *Hoxa10* exibem um fenótipo interrompido de seus aparelhos reprodutivos, no qual a porção proximal do útero é transformada em uma estrutura tubular estreita que se assemelha a um oviduto, sugerindo uma transformação homeótica anterior (BENSON et al., 1996; ZANATTA et al., 2010). Conseqüentemente, esses camundongos têm implante embrionário comprometido na cavidade uterina, embora ovulem e tenham formação preservada de ovócitos. Por sua vez, pacientes com mutações no *HOXA10* apresentaram defeitos uterinos variando de útero septado e vagina com colo uterino

duplo até presença de útero didelfo, indicativo de defeitos na fusão dos DM (CHENG et al., 2011; EKICI et al., 2013).

Ainda nesse contexto, camundongos nocautes de *Hoxa11* apresentaram útero hipoplásico e sem glândulas, compatíveis com uma transformação homeótica parcial (GENDRON et al., 1997). Além disso, camundongos mutantes nos quais o homeodomínio *Hoxa11* foi substituído pelo homeodomínio *Hoxa13* tiveram uma transformação homeótica posterior do ARF, com o útero posterior tornando-se cervix/vagina. Isto demonstra que os genes *Hoxa11* e *Hoxa13* têm funções únicas na diferenciação dos DM e que o *Hoxa13* controla a expressão de fatores necessários para a diferenciação dos DM em colo do útero e vagina (ZHAO E POTTER, 2001). Embora os nocautes de *Hoxa13* morram entre E13.5 a E14.5, embriões mutantes desse gene perderam a porção caudal dos DM sugerindo que o *Hoxa13* possui função na formação dessas estruturas.

Em resumo, os genes das famílias *Wnt* e *Hoxa* são importantes para a formação e desenvolvimento dos DM e sua diferenciação no trato reprodutivo feminino em mamíferos (VAN DER HORST et al., 2012). Além disso, esses genes também têm sido associados a processos de diferenciação do endométrio pós-natal, que ocorrem ao longo da vida reprodutiva. Tem sido demonstrado que anormalidades na função desses genes relacionados originalmente ao desenvolvimento dos DM no período embrionário também podem comprometer os processos de implantação embrionária e decidualização do endométrio, porém os mecanismos e vias envolvidas na sinalização mediada por esses fatores moleculares nos diferentes tipos de células do endométrio ainda são pouco compreendidos (GELLERSEN E BROSENS, 2014). Dessa maneira, o entendimento dos processos pelos quais esses genes atuam em conjunto com outros fatores regulatórios ainda é inicial e requer novos estudos com abordagens em diferentes níveis: *in vitro*, em modelos animais e em seres humanos.

#### 2.4 ODD-SKIPPED RELATED 1 (OSR1)

O OSR1 é um fator de transcrição do tipo *zinc-finger* que tem papel na diferenciação do mesoderma intermediário (rim e coração) já bem definido em diversos mamíferos, porém com papel funcional ainda pouco conhecido em seres humanos. Além disso, o *OSR1* faz parte da família de *pair-rule genes*, os quais são

caracterizados pelo fato de que mutações nesses genes causam perda do desenvolvimento normal em segmentos alternados do embrião (WANG et al., 2005; LAN et al., 2011).

Estudos recentes sugerem que o gene *Osr1* tem associação determinante com vias de sinalização primordiais para a diferenciação do mesoderma intermediário e desenvolvimento das estruturas urogenitais (MULLEN E BEHRINGER, 2014). Embriões de camundongos nocaute para o gene *Osr1* (*Osr1*<sup>-/-</sup>) usualmente morrem entre os dias 11,5 e 12,5 de gestação, devido a severa má formação do coração e agenesia dos rins. Além disso, esses embriões apresentam gônadas e pregas urogenitais hipoplásicas e em geral ausência dos ductos de Wolff do lado esquerdo aos 11 dias de desenvolvimento embrionário (WANG et al., 2005).

O processo pelo qual os tratos reprodutivos masculino e feminino são formados é complexo e ainda pouco compreendido. Diante do papel do *Osr1* na diferenciação precoce do mesoderma intermediário, a hipótese aqui proposta é que o gene *Osr1* poderia exercer papel regulatório na diferenciação dos ductos de Muller no período pré-natal, bem como possivelmente atuar nos mecanismos envolvidos na diferenciação pós-natal do endométrio, durante os processos de receptividade endometrial, implantação embrionária e decidualização.

Os objetivos, métodos, resultados e discussão do presente capítulo foram apresentados abaixo no Manuscrito 1.

### 3 MANUSCRITO 1

**Odd-skipped related 1 as a novel candidate involved in Mullerian Duct development**

***Adriana Lofrano-Porto<sup>1,2,6</sup>, Sidney A. Pereira<sup>1,6</sup>, Andrew Dauber<sup>3,4,5</sup>, Naomi Asimow<sup>6</sup>, Olivia L. Moraes<sup>1</sup>, Petra A.T. Araujo<sup>1</sup>, Ana Paula Abreu<sup>6</sup>, Ceres N.R. Oyama<sup>7</sup>, Michael H. Guo<sup>3,4,8</sup>, Silviene F. Oliveira<sup>9,10</sup>, Han Liu<sup>5</sup>, Charles Lee<sup>10</sup>, Rulang Jiang<sup>5</sup>, Rona S. Carroll<sup>6</sup>, Ursula B. Kaiser<sup>6</sup>***

<sup>1</sup> Molecular Pharmacology Laboratory (FARMOL), Faculty of Health Sciences, University of Brasília-DF, Brazil

<sup>2</sup> Section of Endocrinology, Gonadal and Adrenal Diseases Clinics, University Hospital of Brasília-DF, Brazil

<sup>3</sup> Division of Endocrinology, Boston Children's Hospital, Boston-MA, USA

<sup>4</sup> Program in Medical and Population Genetics, Broad Institute, Cambridge-MA, USA

<sup>5</sup> Division of Endocrinology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati-OH, USA

<sup>6</sup> Division of Endocrinology, Diabetes and Hypertension, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School-Boston, MA, USA

<sup>7</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, University of Brasilia-DF, Brazil

<sup>8</sup> Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston-MA, USA.

<sup>9</sup> Department of Genetics and Morphology, Institute of Biology, University of Brasilia-DF, Brazil

<sup>10</sup> Jackson Laboratory for Genomic Medicine, Farmington-CT, USA

## ABSTRACT

We present a family in which three sisters had a Mullerian Duct (MD) anomaly characterized by uterine hypoplasia, estrogen-unresponsive endometrium, primary amenorrhea, but spontaneous tubal pregnancies. Whole Exome Sequencing followed by comprehensive genetic analysis identified a novel homozygous variant in *Odd-skipped related 1* gene (*OSR1*), p.V108F. To clarify the effects of *Osr1* on MD development, we investigated prenatal and postnatal expression patterns of *Osr1/Osr1* in the MDs and endometrium, respectively, and whether *Osr1* deletion affects MD development, using genetically engineered mice. We showed that *Osr1* is expressed in the MDs and Wolffian ducts (WDs) of E13.5 embryos. Interestingly, MDs are absent on the left side, and rostrally truncated on the right side of E13.5 *Osr1*<sup>-/-</sup> knockouts. *Osr1* is expressed lifelong in WT mice uterus with two distinct peaks at PND14 and PND28-PND35, which correspond to endometrial adenogenesis and puberty initiation, respectively. *Osr1* is expressed mainly in endometrial luminal and glandular epithelial cells, and less in stroma, with a high expression in oviduct epithelium. This pair-rule gene plays critical roles on embryonic patterning and tissue morphogenesis. Through a translational approach, we demonstrated that *OSR1* is a novel candidate among the molecular factors that modulate the formation and differentiation of MD-derived structures.

## Introduction

The Mullerian Ducts (MD) are paired embryonic structures that arise from the mesoderm-derived urogenital ridges, and ultimately develop into the segments of the female reproductive tract (FRT): the oviducts, uterus, cervix, and upper part of the vagina (1). Postnatally, MD derivatives function as the site of fertilization in many vertebrates, including humans and mice, and play fundamental roles in egg transport and nutrition, as well as in embryo development itself, thus determining reproductive success (2, 3).

Mullerian anomalies comprise a heterogeneous group of developmental defects that affect the FRT anatomy and function, ranging from minor uterine abnormalities, such as septate and bicornuate uteri, to congenital absence of uterus and vagina (1, 4). One of the most severe conditions in the spectrum of Mullerian anomalies in humans is known as Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome (MRKH) or uterovaginal agenesis, the second most common cause of primary amenorrhea. Approximately 1 in 4,500 live births have MRKH, representing 15% of women with primary amenorrhea. Rare cases of familial clustering and the association with other congenital defects, such as renal or skeletal malformations, have directed the search for the genetic basis of the disease (4, 5).

We studied a family in which three sisters, born from a consanguineous marriage, presented with a unique Mullerian anomaly characterized by uterine hypoplasia with unresponsive thin endometrium, primary amenorrhea, but spontaneous tubal pregnancies. Our hypothesis was that a recessive genetic factor may have caused this familial phenotype leading to a disruption in Mullerian Duct development and patterning, and a resultant reproductive tract developmental defect characterized by estrogen-unresponsive endometrial hypoplasia and impaired embryo implantation in the uterus. Through Whole Exome Sequencing (WES) followed by comprehensive genetic analysis, Odd-skipped related 1 (*OSR1*) emerged as a candidate gene. *OSR1* is a human homolog of the *Drosophila Odd* gene, which encodes a transcription factor expressed early during embryonic development, since the nascent intermediate mesoderm, and subsequently in multiple mesenchymal derivatives in mice, including the urogenital ridges where MDs originate (6, 7). We therefore aimed to investigate the prenatal and postnatal expression pattern of

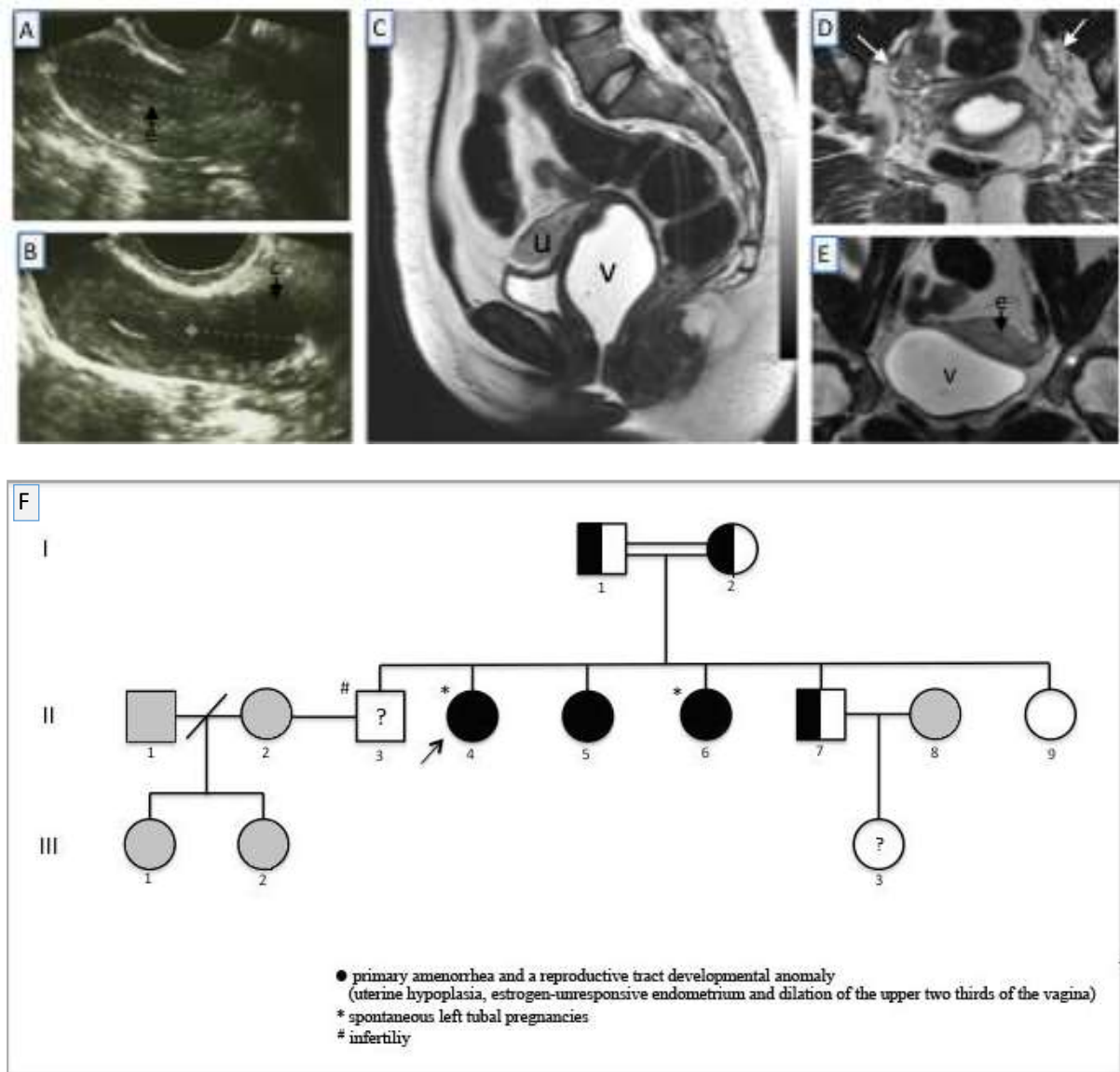
*Osr1/Osr1* in the developing MDs and in the endometrium, respectively, and whether its deletion would affect MD development, using wild-type and genetically engineered mice. Through a translational approach, we demonstrate that *OSR1* is a novel candidate among the molecular factors that modulate the formation and differentiation of MD-derived structures.

## Results and Discussion

### *Human studies: Case reports*

The proband was a 29 year-old Brazilian woman who reported primary amenorrhea, with complete development of secondary sexual characteristics by the age of 12. She started oral contraceptives (OCPs) at age 22, and had three episodes of sparse, mild vaginal bleeding over two years. Systemic and gynecological examinations were unremarkable. Weight: 48.9 Kg; Height: 149.7 cm. Tanner stage M5P5; Karyotype 46,XX. A progesterone challenge test induced no menstrual bleeding. Transvaginal ultrasonography (TVUS) showed an underdeveloped uterus (13 cm<sup>3</sup>) with a thin endometrium (1 mm), a cystic lesion in the left cornual region (18 mm), and apparently normal ovaries (right: 4 cm<sup>3</sup> and left: 1.2 cm<sup>3</sup>, with follicles up to 10 mm) (Figure 1A-B). Weekly hormonal assays and TVUS scans confirmed normal folliculogenesis, ovulation and corpus luteum formation, but impaired endometrial proliferative response (Supplemental Table 1). To further evaluate endometrial estrogen responsiveness, estrogen supplementation was provided (4mg/day; Estrofem®, Medley) but no significant increase in endometrium thickness was detected after 9 weeks. Renal ultrasonography showed no abnormalities. Dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) showed a normal bone density Z-score, further supporting normal estrogen action on peripheral tissues. Pelvic magnetic resonance imaging (MRI) confirmed the TVUS findings and, in addition, revealed widening of the upper third of the vagina (Figure 1C, D and E). At the age of 33, a left tubal pregnancy was documented by ultrasonographic visualization of a typical anexial mass and elevated serum  $\beta$ -hCG levels, and was treated conservatively.





**Figure 1. Female reproductive tract imaging features and family pedigree of a 29-year-old woman (proband) with primary amenorrhea due to a reproductive tract developmental anomaly.** (A) Transvaginal ultrasonographic imaging showing a small uterus (*dotted line*) with a very thin endometrial line (*e*), and (B) a left cornual cystic dilation (*c*); (C-E) Sagittal, oblique coronal and coronal (respectively) MRI T2-weighted FRFSE pelvic sections with vaginal distention using aqueous gel showing: widening of the upper two thirds of the vagina (*v*), a hypoplastic uterus in anteversion (*u*), normal appearing ovaries (*white arrows in D*), and hypoplastic uterus with thin endometrium (*e*); (F) Family pedigree. The three affected sisters are homozygous for the novel missense mutation in the *OSR1* gene (p.V108F) (*black circles*). The proband (II.4) and her affected sister (II.6) developed spontaneous left tubal pregnancies. Parents (I.1 and I.2) are first-degree cousins and are heterozygous for the mutation, as is a fertile brother (II.7). The infertile male sibling (II.3) and the niece (III.3) were not available for clinical and genetic evaluation. Unrelated individuals are represented in *gray* (not studied).

Family history was notable for parental consanguinity (first-degree cousins) and two sisters who also had primary amenorrhea with normal secondary sexual characteristics and hormonal levels, despite underdeveloped uteri and endometrial thinning. Interestingly, one of these sisters also reported a prior left tubal pregnancy.

Serial hormonal and pelvic ultrasonographic findings of all three affected sisters are summarized in Supplemental Table 1. One brother was presumably infertile based on the history of trials to conceive over more than 2 years with his wife who already had two daughters from a previous marriage, but he did not present for medical examination. Two unaffected siblings were evaluated: a fertile brother, and a sister with normal pubertal development, normal uterine appearance on TVUS and regular menstrual cycles, who had never attempted to become pregnant. The family's pedigree is shown in Figure 1F.

The diagnosis of a distinct familial mullerian anomaly, characterized by uterine underdevelopment, estrogen unresponsive endometrial thinning, widening of the upper third of the vagina and spontaneous tubal pregnancies was proposed.

**Supplemental Table 1.** Weekly pelvic ultrasound scans and hormonal monitoring of three sisters with a complex Mullerian anomaly<sup>1</sup>.

	II.4 (proband)				II.5				II.6				Normal values <sup>2</sup>
	Wk 1	Wk 2	Wk 3	Wk 4	Wk 1	Wk 2	Wk 3	Wk 4	Wk 1	Wk 2	Wk 3	Wk 4	
<b>FSH</b> (mIU/mL)	10.0	7.5	16.5	5.2	9.6	8.6	3.3	12.3	7.9	10.0	7.9	6.1	F: 2.5 - 10.2 M: 3.4 - 33.4 L: 1.5 - 9.1
<b>LH</b> (mIU/mL)	4.9	6.6	<b>37.6</b>	4.3	<b>21.0</b>	<b>15.6</b>	3.9	10.2	3.9	8.0	7.9	<b>14.9</b>	F: 1.9 - 12.5 M: 8.7 - 76.3 L: 0.5 - 16.9
<b>E2</b> (pg/mL)	7.0	22.9	46.8	54.6	87.9	63.7	138.1	53.7	10.1	7.0	35.8	436.3	F: 19.5 - 144.2 M: 63.9 - 356.7 L: 55.8 - 214.2
<b>P</b> (ng/mL)	0.2	<0.2	0.7	<b>8.7</b>	<0.2	<b>7.2</b>	<b>5.7</b>	0.6	0.2	<0.2	<0.2	0.3	F: 0.15 - 1.40 L: 3.3 - 25.5
<b>Endometrium<sup>3</sup></b> (mm)	1	1	3	3	0	1	0	2.2	0	1	1	2.4	F: 4.0 - 8.0 L: 8.0 - 12.0
<b>Ovarian Follicles<sup>4</sup></b> (mm)	10	12	CL	3	12	5	6	6	10	7	10	CL	variable
<b>Uterus</b> (cm <sup>3</sup> )	13	18	18	18	14	19	15	18	20	20	17	19	nulliparous: 28 - 65

<sup>1</sup> Ultrasonographic monitoring was performed weekly, by the same ultrasonographer, during 4 weeks (wk 1-4).

<sup>2</sup> Normal values for adult women (chemiluminescent assays). F: Follicular phase; M: Midcycle; L: Luteal phase.

<sup>3</sup> Endometrium thickness. "0" means undetectable. F: Follicular phase (~ approximately); L: Luteal phase.

<sup>4</sup> Maximum diameter of the ovarian follicles detected; CL: corpus luteum.

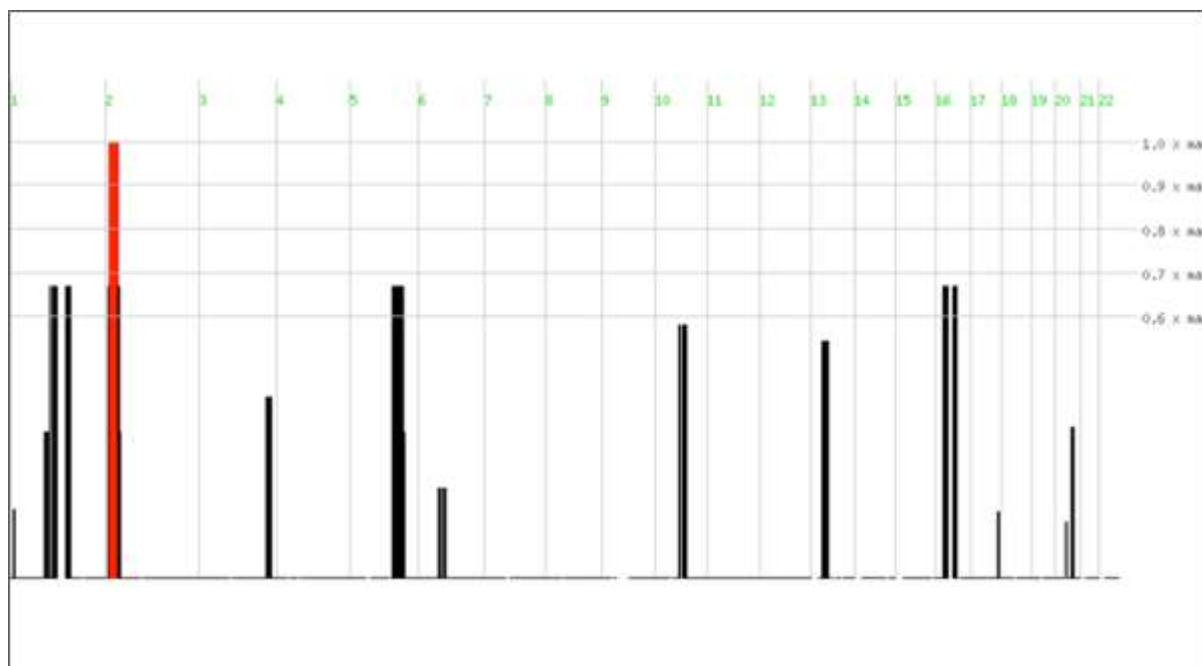
LH levels in the midcycle ovulatory range and progesterone levels in the luteal range are highlighted in bold.

### *Genetic studies*

Given the extreme rarity of the phenotype and the consanguinity, we performed whole exome sequencing (WES) and postulated that this novel syndrome was due to a homozygous recessive variant. Therefore, we selected homozygous variants from the WES data that were present in homozygosity in all three affected sisters but were not homozygous in the unaffected sister (8). We only included novel variants not present in the 1000 Genomes database and the NHLBI Exome Variant Server nor in other samples sequenced in the same run. Based on this analysis, a novel missense variant was identified in the *OSR1* gene, p.V108F. Familial segregation analysis confirmed the autosomal recessive mode of inheritance (Figure 1F). Moreover, the p.V108F variant were not found in 50 unrelated Brazilian controls.

Array-CGH excluded the existence of copy number variations (CNVs) that might be associated with the phenotype, thereby strengthening the association of the candidate variant identified in the exome with the phenotype.

We next performed homozygosity mapping from the whole exome sequencing data (9), with the assumption that the affected sisters would share a stretch of homozygosity not found in the unaffected siblings. In total, 42,056 SNPs were used in the homozygosity mapping analysis. Homozygosity mapping yielded a single lead peak of homozygosity on chromosome 2. The peak extended from chr2:9634856 to chr2:31467351 (hg19 coordinates). The next most significant peaks had homozygosity scores roughly 70% of the lead peak (Supplemental Figure 1). This homozygosity analysis further supports a recessive condition with the causal variant being found in this region of chromosome 2, where *OSR1* resides.



**Supplemental Figure 1. Homozygosity mapping results.** Homozygosity mapping was performed from whole exome data using HomozygosityMapper. The x-axis represents chromosomes in which the selected variants were located (chromosomes' numbers indicated at top of chart). Homozygosity scores (normalized to the lead peak, and indicated to the right of the chart) are displayed on the y-axis. The highest scoring peak is highlighted in red, while less highly scoring peaks are in black.

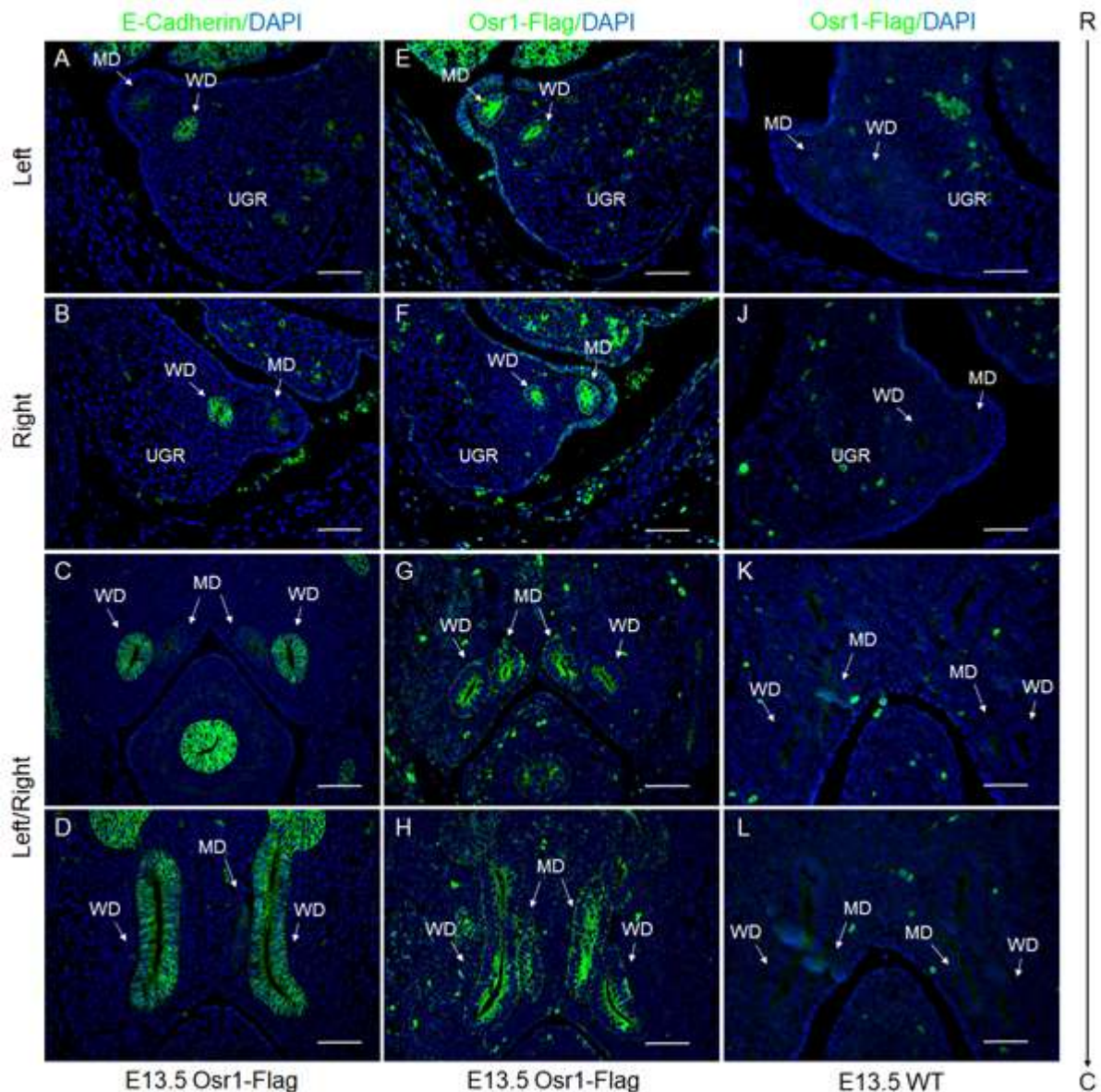
We then conducted gene prioritization of the 126 RefSeq genes located in the homozygosity peak on chromosome 2 using Endeavour (10). Endeavour prioritizes candidate genes based on their similarity (as calculated from data sources such as functional annotations and gene expression) to known genes involved in a biological process or disease (training set). Using a list of 13 genes previously implicated in uterine development as the training set, we prioritized all genes found in the stretch of homozygosity. Among those, *OSR1* ranked very highly (6 out of 126; p-value 0.00702). This analysis is independent of the exome variant analysis (but not the homozygosity analysis) and it is thus very interesting that one of the top ranked genes happened to be the one in which our subjects had a novel missense variant. Altogether, the genetic analysis supports the potential pathogenicity of the *OSR1* variant in the affected sisters.

### *Mouse embryo studies (prenatal development)*

*OSR1* pertains to the pair-rule family of genes characterized by the effects of mutations in them, which impair developmental patterns in alternating segments of the embryo (11). Pair-rule genes play critical roles on embryonic patterning and tissue morphogenesis. Odd-skipped-related protein 1 is expressed at a very early embryonic stage in the intermediate mesoderm and seems to regulate the differentiation of multiple mesenchymal derived structures, including the formation of the urogenital tract (12).

In keeping with its primordial involvement in organogenesis, previous studies from Wang et al (2005) showed that most mouse embryos homozygous for a targeted *Osr1* null mutation (*Osr1*<sup>-/-</sup>) die very early, between E11.5 and E12.5, due to multiple anomalies including kidney agenesis and severe cardiac defects. Moreover, *Osr1*<sup>-/-</sup>embryos display hypoplastic gonadal ridges and disrupted Wolffian ducts (WD) formation at ages E10-E11.5. Interestingly, early WD development is impaired mainly in the left side and most E11.5 embryos had truncated or absent WDs on the left side at E11.5 (7).

Indeed, in mice, MD elongation into the mesonephric mesenchyme is highly dependent on WD development and, specifically, on the secretion of Wnt9b by the surrounding WD epithelial cells (13). Therefore, since WD development is impaired by *Osr1* abrogation, we hypothesized that an analogous MD defect would result in *Osr1* knockout embryos. To clarify the effects of *Osr1* on MD development, we first addressed the expression of *Osr1* protein in the MDs of the newly generated 2xFlag-tagged *Osr1* embryos, which harbor two copies of the Flag epitope sequence tagged to their functional wild-type *Osr1* alleles, with no interference with *Osr1* expression. Using this embryonic mouse model, we found that *Osr1* is expressed in the MDs, as well as in the WDs, in their entire extension, ie, from rostral segments to caudal terminations at E13.5 embryos (Figure 2).

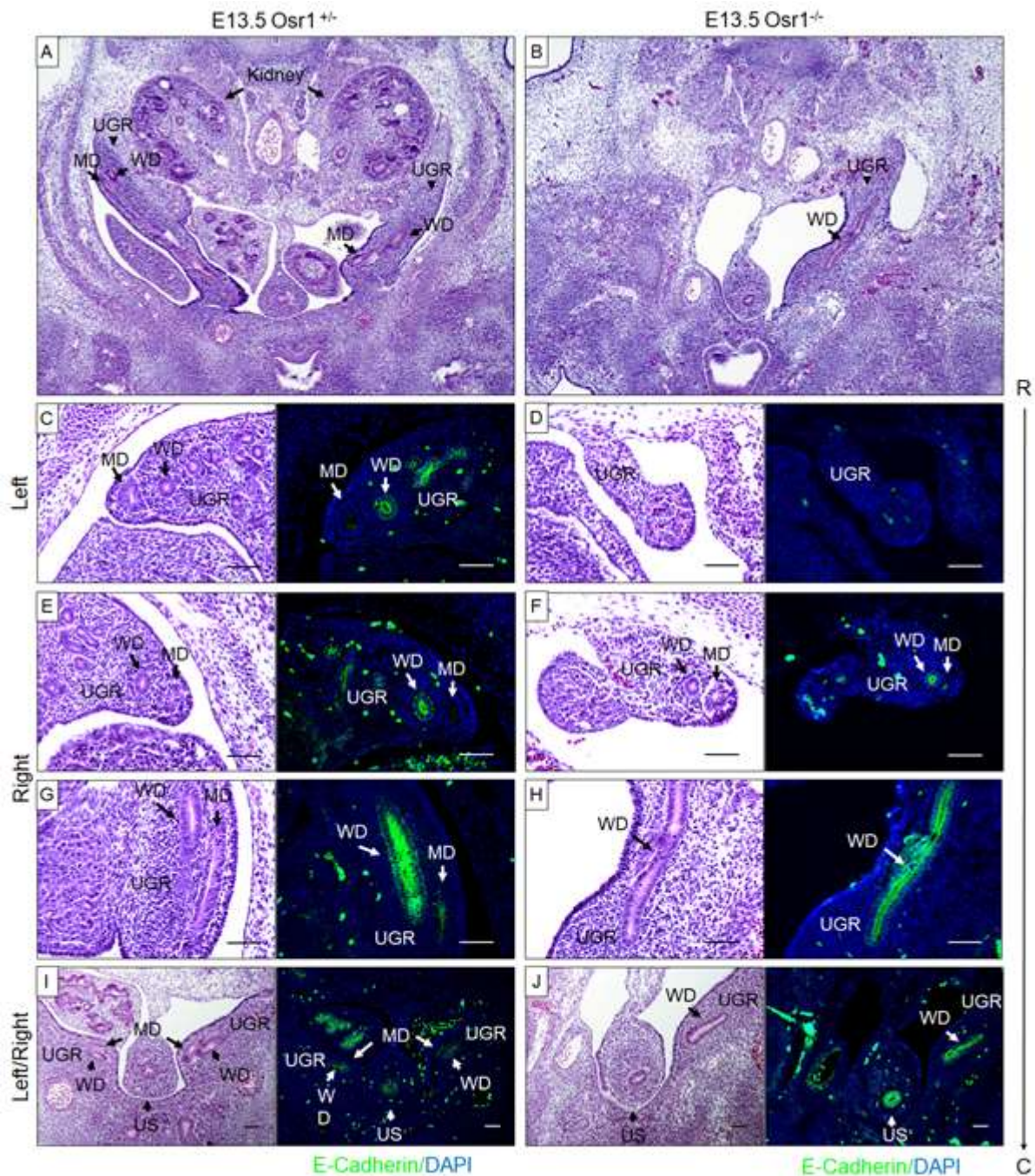


**Figure 2. Osr1 expression in the Mullerian ducts (MDs) of 2xFlag-tagged Osr1 E13.5 mouse embryos.** (A-D) Sections of urogenital ridges showing Wolf ducts (WDs) distinguished from Mullerian ducts (MDs) by staining for E-cadherin, which is an epithelial marker specifically expressed in WDs at E13.5, but not at MDs. (E-H) Osr1 is expressed in the MDs, as well as in the WDs, in their entire extension, ie, from rostral segments to caudal terminations. (I-L) Sections of wild type E13.5 embryos at the same levels were used as negative controls. MD, Mullerian duct; WD, Wolf duct; UGR, urogenital ridge; R, rostral, C, caudal; WT: wild type. Scale bars: 100 $\mu$ m

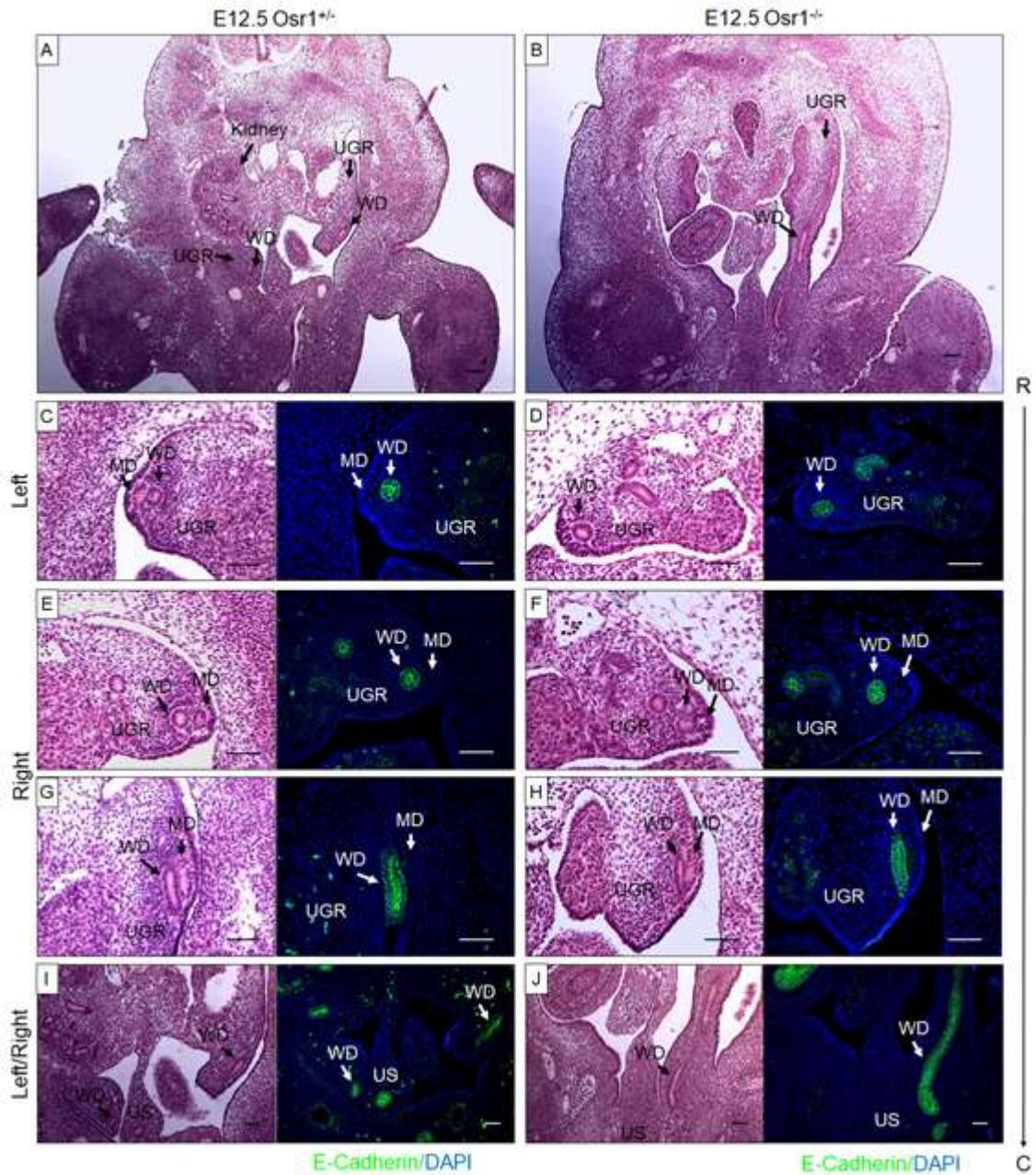
Then we analyzed the morphological appearance of the MDs in E12.5-E13.5 Osr1<sup>-/-</sup> global knockout mice, compared with Osr1<sup>+/-</sup> littermates. While WDs were often absent only on the left side of E13.5 Osr1<sup>-/-</sup> embryos, but preserved on the right side, the MDs were systematically absent on the left side, and often rostrally

truncated on the right side as well. (Figure 3). This asymmetric pattern of disruption of WD formation was noted since a younger stage (E12.5) and was also limited to the left side, whereas the morphology of the WDs on the right side was apparently preserved. The rostrally formed MD structure that is usually seen bilaterally in close contact with WDs at E12.5 wild-type embryos was also detectable only on the right side of *Osr1*<sup>-/-</sup> E12.5 embryos. (Supplemental Figure 4). These findings support the idea that MD development, mainly elongation, is highly dependent of normal WD development. However, a direct, WD-independent effect of *Osr1* on MD formation could not be ruled out, as even in the presence of morphologically normal WDs on the right UGRs, MDs did not elongate properly on this side either (Figure 3).





**Figure 3. Disruption of Mullerian (MDs) and Wolffian ducts (WDs) development in E13.5 *Osr1*<sup>-/-</sup> global knockout (KO) embryos. Mullerian ducts (MDs) are absent on the left side and rostrally truncated on the right side in E13.5 *Osr1*<sup>-/-</sup> knockouts. (A and B) Absence of MDs and WDs on the left side of an E13.5 *Osr1*<sup>-/-</sup> KO embryo, compared with a *Osr1*<sup>+/+</sup> littermate. (C-J) H&E stained sections and specific E-cadherin immunostaining of the WDs at the same urogenital ridges' levels showing that the MDs are absent on the left side and rostrally truncated on the right side, while WDs are truncated in the left side, but developed apparently normally on the right side of the E13.5 *Osr1*<sup>-/-</sup>. MD, Mullerian duct; WD, Wolffian duct; UGR, urogenital ridge; US, urogenital sinus; R, rostral, C, caudal. Scale bars: 100µm**

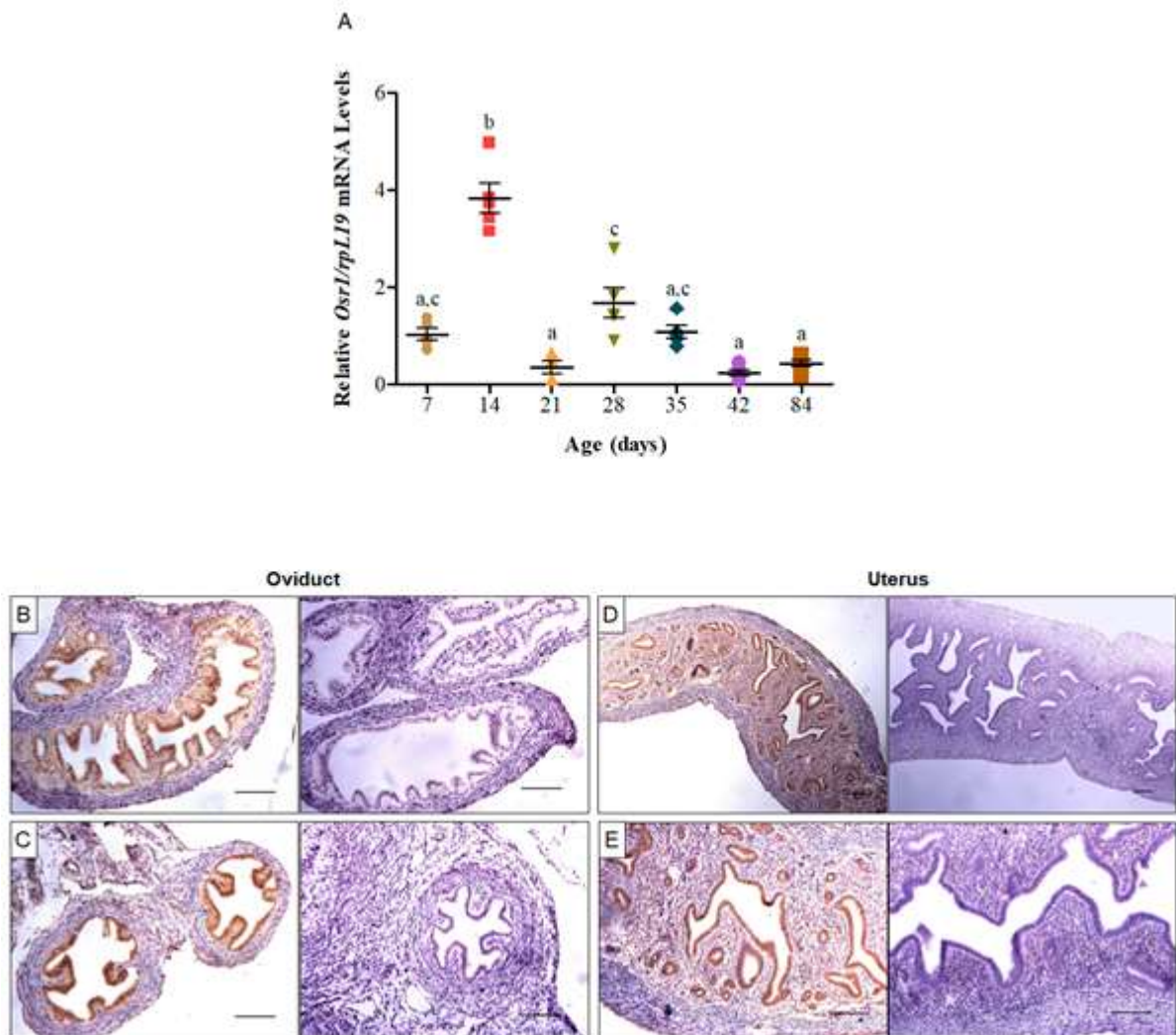


**Supplemental Figure 4. Disruption of Mullerian (MDs) and Wolffian ducts (WDs) development in E12.5 *Osr1*<sup>-/-</sup> global knockout (KO) embryos. Mullerian ducts (MDs) are absent on the left side in E12.5 *Osr1*<sup>-/-</sup> knockouts. (A and B) Absence of MDs and WDs on the left side of an E12.5 *Osr1*<sup>-/-</sup> KO embryo, compared with a *Osr1*<sup>+/+</sup> littermate. (C-J) H&E stained sections and specific E-cadherin immunostaining of the WDs at the same urogenital ridges' levels showing that the MDs are absent on the left side, while WDs are truncated in the left side, but developed apparently normally on the right side of the E12.5 *Osr1*<sup>-/-</sup>. MD, Mullerian duct; WD, Wolf duct; UGR, urogenital ridge; US, urogenital sinus; R, rostral, C, caudal. Scale bars: 100µm**

*Mouse female reproductive tract studies (postnatal development)*

In order to further characterize the expression pattern of *Osr1/Osr1* in the developing FRT, we studied whole uteri of C57BL/6 mice across different stages of postnatal development. First we found that *Osr1* mRNA is expressed lifelong in the uterus, and that its expression is significantly higher in PND14 as compared to all other postnatal stages, followed by a secondary smaller peak starting at PND28 and lasting until PND35. These findings are remarkable, considering that tissue-specific uterine histoarchitectural development is completed only some days postnatally, at PND15, when endometrial adenogenesis and mesenchymal specification have occurred. Indeed, the highest expression of *Osr1* at PND14 coincides with those two crucial processes that define the completion of uterine development in mouse. Not less interesting is the fact that the secondary *Osr1* expression peak overlaps with the pubertal transition in mice (PND28 to PN35) (Figure 4A).

To investigate more deeply the localization of *Osr1* in the fully developed FRT, we used *Osr1-lacz* mice at PND30. At this time point, puberty has just started and any significant estrogenic effect on the endometrial cells is unlikely. We showed that *Osr1* protein is expressed mainly in the luminal and glandular epithelial cells of the uterus, and less in the endometrial stroma, with a high expression also in the epithelial cells of the oviducts (Figure 4B-E).



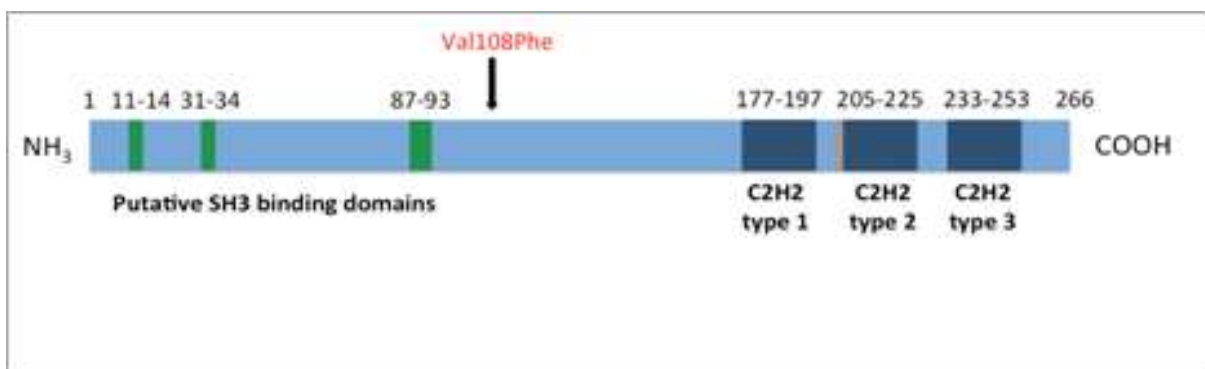
**Figure 4. Postnatal expression of *Osr1/Osr1* in the developing female reproductive tract (FRT).** (A) *Osr1* mRNA is expressed lifelong in the mouse uterus with a higher peak at postnatal day 14 (PND14), followed by a secondary smaller peak starting at PND28 and lasting until PND35. Data represent mean  $\pm$  SEM. Groups with different letters differ significantly from each other ( $P < 0.05$ ; ANOVA/Tukey) ( $n=5/\text{group}$ ). (B-E) *Osr1* is highly expressed in the oviduct epithelium, and mainly in the luminal and glandular epithelial cells, but also in the endometrial stroma. Scale bars: 100 $\mu\text{m}$ .

Therefore, the expression pattern of *Osr1* in the postnatal mouse FRT, both at the transcriptional and translational levels, is in keeping with a putative role of this transcription factor in the histological patterning of the FRT, particularly endometrial and oviduct epithelial compartments.

### *Translational considerations*

*OSR1* expression has been demonstrated in many human tissues, and in some cancer cell lines. However, its expression pattern in the human reproductive tract had not been deeply explored, although *OSR1* protein has been detected in the endometrium, fallopian tubes, ovary and placenta (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000143867-OSR1/tissue>) (6, 14).

In the present study, a homozygous *OSR1* mutation was associated with a distinct isolated reproductive tract anomaly. The absence of urological or cardiac abnormalities in the affected women may be related to redundant functions of odd-skipped genes, or to partial or selective gene inactivation resulting from a single missense mutation rather than a complete gene knockout, which in mice leads to severe malformations precluding post-natal life. The human *OSR1* gene encodes a predicted 266-amino acid protein containing three C2H2-type zinc fingers and several putative PXXP *Src-homology 3* (SH3) binding motifs (6). However, the *OSR1* V108F mutation is not located in any of these sites (Supplemental figure 3). Indeed, it is conceivable that the affected domain might impact FRT development selectively, to a greater extent than other tissues. Alternatively, it is possible that other homologous genes, including *OSR2*, might partially compensate for the impaired *OSR1* function during early kidney development in humans, in contrast to mice. Accordingly, mouse *Osr1* and *Osr2* share 98% identity in their zinc-finger (zfn) domains, and have overlapping expression patterns during embryogenesis (12, 15).



**Supplemental Figure 3.** Schematic representation of *OSR1* domains, with the location of the homozygous mutation (marked in red) identified in three sisters with uterine hypoplasia and estrogen-unresponsive endometrium; two of the sisters also had tubal pregnancies. SH3: Src homology 3; C2H2: Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> zinc finger domain.

Interestingly, a synonymous variant allele of *OSR1*, rs12329305, has been associated with reduced nephron number in healthy newborns, and was predicted to impair spliceosome binding and mRNA stability in cultured cells (14). Whether this association occurred by chance, or if some compensatory mechanisms prevent its clinical impact in kidney function is still unclear. While inactivation of the *Osr1* gene in mice severely compromises metanephric mesenchyme formation, the variant *OSR1* rs12329305(T) does not seem to have a major impact on the nephrogenic phenotype in adult humans, which may be analogous to the novel V108F *OSR1* mutation described herein.

It is reasonable to postulate a possible effect of the V108F *OSR1* mutation on the sequential activation or repression of signalling molecules that underlie the development of the müllerian-derived structures. There is evidence that the *Osr1* gene acts upstream of many transcriptional regulators of the intermediate mesoderm cell fate patterning, particularly for those involved in kidney development (16). However, direct *Osr1* targets are currently elusive. We showed *Osr1* expression both in the WDs and in the elongating MDs, and that *Osr1* ablation disrupted formation of these structures. These findings support that *OSR1* mediates the temporospatial differentiation of the reproductive tract precursors.

Interestingly, some of the developmental genes currently known to be involved in the urogenital precursors differentiation are also expressed in the adult reproductive tissues, under modulation of sex steroids. Those genes play primary roles in the differentiation of the endometrium during the reproductive cycle, decidualization, embryonic implantation and other postnatal process that ultimately lead to fertility (2). It is noteworthy that all of the genes whose function were thus described and which were located in the homozygosity peak in the three affected sisters were included in our prioritization analysis, which in turn corroborated *OSR1* as a very likely candidate to be part of this regulatory pathway, based on functional and temporospatial expression analogy. By analogy, our mice data regarding *Osr1* expression in the adult FRT and its embryonic precursors, and the abrogation of MD development in *Osr1*<sup>-/-</sup> knockouts may be partially translated into the human FRT phenotype associated with the *OSR1* V108F mutation.

Indeed, most of the current knowledge about MD formation comes from studies on mouse and chicken embryos and involves close interactions between

forming epithelial and mesenchymal cells, in which several members of the Wnt family of secreted growth factors play determinant roles (3, 17). Among them, Wnt9b is believed to be the main WD-derived signal required for MD elongation, and its targeted deletion results in Mullerian agenesis in mice, while rare human mutations have been described in association with MRKH phenotype (18). Wnt7a, in turn, is considered a marker of MD elongation and is expressed in the MD epithelium during its differentiation and patterning. *Wnt7a*<sup>-/-</sup> mice have abnormal MD-derivatives, characterized by posterior homeotic transformation, in which oviducts are histologically similar to uterus, while uterus transforms to a vagina-simile structure (19, 20).

One of the functions of *Wnt7a* is the maintenance of *Hoxa10* and *Hoxa11* segmental expression along MD development, which is needed for proper patterning (3). *Hoxa10* plays important roles during the embryonic development of the uterine epithelium, stroma and muscle (21), whereas its paralog *Hoxa11* is mainly involved in the formation of uterine glands and early decidua (22). These genes encode transcription factors characterized by a distinct temporospatial expression pattern, which is essential for the determination of the body's anterior-posterior axis. They are also expressed in the adult endometrium, under regulation of sex steroids, and may participate in embryo implantation, in a process similar to cell fate specification during embryogenesis (21). *Hoxa10* knockout female mice display a disrupted FRT phenotype, in which the uterus is transformed into a narrow tubular structure that resembles an oviduct (23). These mice have impaired embryo implantation in the uterine cavity, although they ovulate and have preserved egg formation. Similarly, abrogation of *Hoxa11* leads to implantation defects due to reduced endometrial stromal, glandular and decidual development in mice (22).

The occurrence of tubal pregnancy in the setting of an estrogen-unresponsive endometrium in two of the three sisters suggest the existence of an abnormal uterine environment which might be unfavorable for implantation of the embryo, which may be in some extent similar to the disrupted FRT functional patterning observed in *Hoxa10* and *Hoxa11* null mice (22, 23), as well as in *Wnt7a*<sup>-/-</sup> mice (19). Altogether, our results corroborate a role for *OSR1* itself, or genes regulated by *OSR1*, in FRT development and endometrial differentiation during adult life, particularly at the time of embryo implantation. We suspect that defective *WNT7A/HOXA10/HOXA11*

signalling may contribute to this abnormality. Moreover, a presumptive relationship of OSR1 protein with estrogen and other sex steroids actions on the FRT needs further investigation.

In summary, we propose that the OSR1 mutant may have impaired the coordinated actions of other transcription factors or signaling molecules that regulate MD patterning with an impact in endometrial differentiation and function across the reproductive life in the affected women. The resulting FRT developmental patterning anomaly may have impaired embryo implantation in the uterine cavity, thus favouring ectopic pregnancy. However, the exact mechanisms by which OSR1 would affect the regulatory pathways underlying MD patterning in humans deserve additional investigation. An association between OSR1 and FRT anomalies has not been described previously. Future studies are necessary to clarify the mechanisms of the action of *OSR1* in FRT development and function lifelong.

## **Supplemental Material**

### **Methods**

*Statistics.* Data were analyzed using the GraphPad Prism 5.0 statistical package. Relative mRNA expression was analyzed using One-way ANOVA followed by Tukey post hoc test. All data sets are presented as mean  $\pm$  SEM.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

*Study approval.* The study was approved by the Ethics Committee on Human Research from the Faculty of Medicine, University of Brasilia, Brasilia-DF, Brazil. All participants were studied after written informed consent. The mouse studies were approved by the Brigham and Women's Hospital Standing Committee on the Use of Animals in Research and Teaching in the Brigham and Women's Hospital Center for Comparative Medicine. The mice were maintained under a 12h light/dark cycle and provided with standard rodent chow and water *ad libitum*.



## **Genetic Studies**

### *Whole Exome Sequencing (WES) and familial segregation analysis by conventional Sanger sequencing*

Genomic DNA from all participants was obtained from peripheral blood leukocytes using the salting-out method. DNA samples of the three affected sisters and one unaffected sister were subjected to whole exome sequencing at the Broad Institute (11). Familial segregation of the variant selected based on the WES result was confirmed by PCR amplification and conventional Sanger sequencing. Confirmatory PCR reactions were done using DNA samples obtained after a second blood collection of the three affected and one unaffected sister and, additionally, of the mother, the father and one fertile brother.

### *Array-Comparative Genomic Hybridization (aCGH)*

In order to investigate whether copy number variations (CNVs) could be associated with the phenotype, aCGH was performed using DNA samples from all siblings who agreed to participate in this study (Supplemental reference 1). A 1x1M Agilent SurePrint G3 Human CGH Microarray was used, in which one sample is hybridized to one full slide with a total of 1 million oligo probes. The Agilent aCGH protocol was executed using reference samples of genomic male or female pooled DNA (G1471 and G2051, Promega Corporation, Madison, WI, USA), depending on the sex of the individual analyzed. These reference samples consist of pooled purified DNA samples from healthy individuals with no known pathological aberrations. The slides were scanned using the SureScan Microarray Scanner and initial analysis was performed using Agilent's Feature Extraction Software to process the array image files and calculate quality control metrics (QC metrics). Aberration calls were determined by using both the Agilent CytoGenomics and the Agilent Genomic Workbench analysis softwares (setting: ADM-2). Our goal was to identify CNVs shared between the parents (or at least one of them) and their three affected daughters. CNVs that were shared with unaffected siblings were excluded.

### *Homozygosity Mapping*

Homozygosity mapping was performed from WES data using HomozygosityMapper. To ensure maximum accuracy, we filtered for variants called from WES to include only autosomal SNPs present in dbSNP. We further excluded any variant calls with read depth less than 20 reads. These filters were performed using the Genome Analysis Tool Kit v2.5-2. Genetic homogeneity among affected individuals was required and homozygous stretches longer than 15 SNPs also present in the unaffected sibling were excluded. Block lengths were limited to 250 SNPs and only homozygous blocks longer than 80 SNPs were included.

### *Gene Priorization*

Prioritization analysis of the genes located in the homozygosity peak was performed using Endeavour (<http://homes.esat.kuleuven.be/~bioiuser/endeavour/index.php>). Genes previously implicated in Mullerian duct development were used as a training set (*LHX1*, *PAX2*, *EMX2*, *WNT4*, *WNT7A*, *WNT5A*, *WNT9B*, *HOXA10*, *HOXA11*, *HOXA13*, *RARG*, *CTNNB1*, and *DLG1*). All RefSeq genes located in the homozygosity mapping peak were used as the candidate gene set. All data sources available in Endeavour were used to build the models.

## **Mouse Studies**

### *Experimental Design and Mouse models*

a) To characterize the prenatal expression pattern of Osr1 protein in the MDs, we performed immunolocalization of Flag-Osr1 protein in the urogenital ridges of 2xFlag-Osr1 embryos at age E13.5 (provided by Dr. Rulang Jiang, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA). Wild-type C57BL/6 E13.5 embryo sections were used as negative controls.

b) To investigate the effects of Osr1 ablation on MD morphology, we generated a global knockout mouse model, by serially crossing *Osr1<sup>fl/fl</sup>* mice (provided by Dr. Rulang Jiang, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH,

USA) with an Ella-Cre transgenic mice, which express Cre-recombinase in the early embryo and cause deletion of loxP-flanked sequences in most tissues including germ cells. We evaluated MD morphology in H&E stained sections of urogenital ridges from embryos aged E12.5 and E13.5. WDs were distinguished from MDs by immunofluorescent staining for E-cadherin, an epithelial marker which has been shown to be specifically expressed in WDs, but not in MDs at E13.5.

c) To investigate the expression pattern of *Osr1* mRNA in the developing FRT across different stages of postnatal development we used whole uteri from wild type C57BL/6 mice at postnatal days 7, 14, 21, 28, 35, 42 and 84.

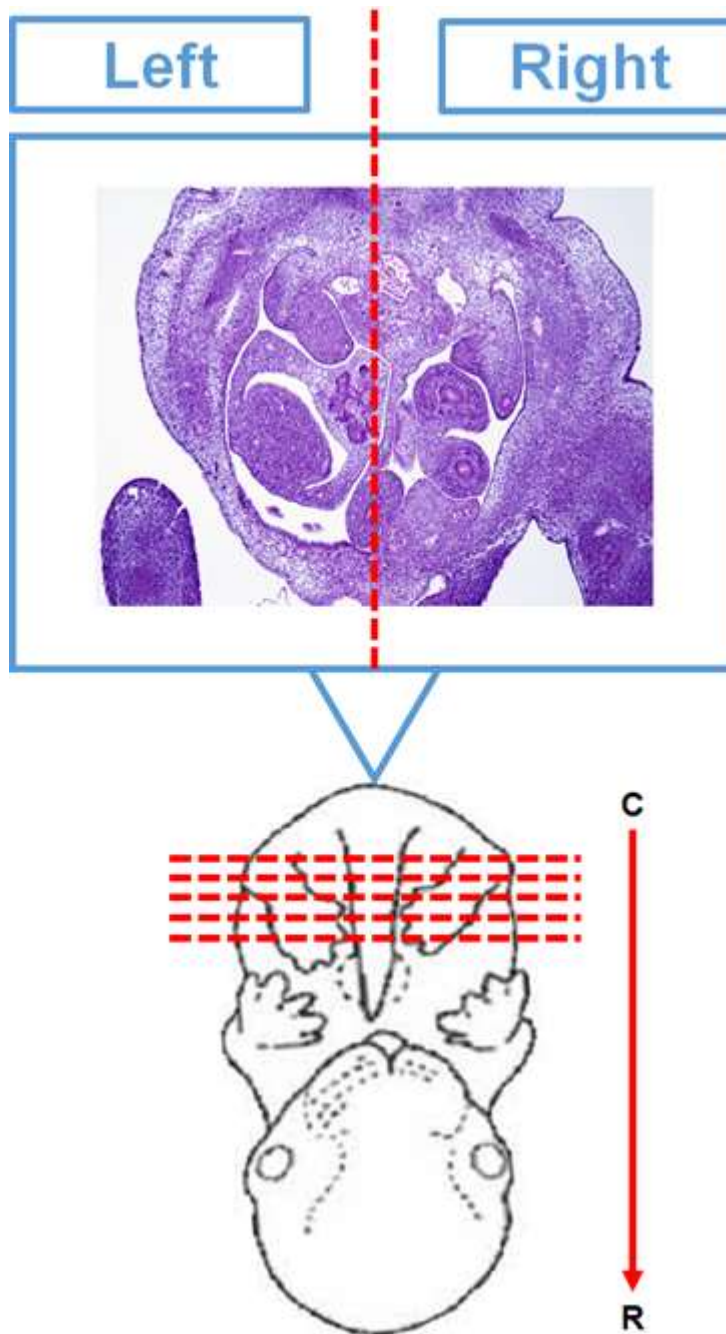
d) To further determine the localization of *Osr1* in the postnatal FRT we used samples from *Osr1-lacZ* reporter mice (provided by Dr. Rulang Jiang, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA) at PND30, which were generated by the insertion of a *LacZ* gene into the first coding exon of *Osr1* through homologous recombination in ES cells. Sections from wild-type uteri were used as negative controls.

#### *Sample collection and preparation*

The postnatal wild-type animals were euthanized and their uteri were collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for qPCR analysis. The uteri from PND30 *Osr1-LacZ* females and the embryos (at E12.5 or E13.5) from different transgenic mice were dissected, fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hours and then kept in PBS1X before being embedded in paraffin for histology and immunohistochemistry.

#### *Histology and immunohistochemistry*

The embryos and uteri were embedded in paraffin (Harvard Medical School Rodent Pathology Core) and sectioned (7  $\mu\text{m}$ ) for hematoxylin and eosin (H&E) staining or immunohistochemistry. All embryos were sectioned from caudal to rostral (head down) allowing the identification of their right and left sides (Supplemental Figure 2). Images were acquired under 4x, 10x or 20x magnification.



**Supplemental Figure 2. Schematic representation of embryos sections making.** All embryos were sectioned from caudal to rostral (head down) allowing the identification of their right and left sides. C: caudal; R: rostral.

For the immunohistochemistry of Flag-Osr1, Lacz-Osr1 and E-cadherin, uteri and embryos sections were deparaffinized in xylene, hydrated in 100% and 70% ethanol and submitted to heat-mediated antigen retrieval in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) for 20 minutes, 97°C. Thereafter, tissue slides were blocked in a

humid chamber in PBS1X- Triton™ X-100 -0,3% (Sigma Aldrich)-NGS 5% for 2 hours at RT. Sections were subsequently incubated in a humid chamber overnight at 4°C with the specific primary antibodies: mouse monoclonal anti-flag, clone M2 (1-200, Sigma Aldrich, F1804), rabbit polyclonal anti-beta Galactosidase (1-500, Thermo Fisher Scientific, 11132) or mouse anti-E-cadherin (1-200, BD Biosciences, 610181) diluted in PBS1X-Triton™ X-100-0,3% (Sigma Aldrich)-NGS 1%. For Lacz-Osr1 staining, slides were incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (1-1000, Vector lab) for 1 hour. The reaction product was visualized using 3,3'-diaminobenzidine-DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit (Vector lab). Sections were counterstained with hematoxylin and mounted with mounting medium (Sigma Aldrich). For Flag-Osr1 and E-cadherin, slides were incubated with anti-mouse Alexa Fluor 488 secondary antibody (1-1000, Thermo Fisher Scientific) for 1 hour. Slides were mounted with Vectashield mounting medium with DAPI (Vector lab). The images were captured by using a fluorescent/light microscope.

#### *RNA Extraction and Quantitative Real-Time RT-PCR*

Total RNA from whole uteri was extracted by TRIzol reagent (Invitrogen, California, US) following the manufacturer's protocol. RNA amount and purity were checked by a spectrophotometer (NanoVue Plus, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK). RNA was subsequently treated with DNase I (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, US) to avoid genomic DNA contamination. Reverse transcription (RT) and quantitative real time PCR (qPCR) were carried out with 5 ng of total RNA using Power SYBR1 Green RNA-to-CT™ 1-Step kit (Applied Biosystems, Foster City, US), along with (5 pmol/μL) of primers, and were performed in an AB7500 PCR machine (Applied Biosystems, Foster City, US). Relative mRNA levels were measured using *rpL19* as a reference gene and calculated by the comparative threshold cycle (Ct) method, according to the formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Ref.). Oligonucleotides used for *Osr1* amplification were sense 5'-CTGATGAGCGACCTTACACC-3' and antisense 5'-TGAGTGTAGCGTCTTGTGG-3', and for *rpL19*, sense 5'-CTGAAGGTCAAAGGGAATGTG-3' and antisense 5'-GGACAGAGTCTTGATGATGTC-3'.

## References

1. Jacquinet A, Millar D, Lehman A. Etiologies of uterine malformations. *Am J Med Genet.* 2016;170(8):2141-2172.
2. Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med.* 2012;18(12):1754–1767.
3. Kobayashi A, Behringer RR. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nat Rev Genet.* 2003;4(12):969–980.
4. Grimbizis GF, et al. The ESHRE/ESGE consensus on the classification of female genital tract congenital anomalies. *Hum Reprod.* 2013;28(8):2032–2044.
5. Massé J, Watrin T, Laurent A, Deschamps S, Guerrier D, Pellerin I. The developing female genital tract: from genetics to epigenetics. *Int J Dev Biol.* 2009;53(2-3):411–424.
6. Kato M. Molecular cloning and characterization of OSR1 on human chromosome 2p24. *Int J Molec Med.* 2002;10(2):221–225.
7. Wang Q, Lan Y, Cho E, Maltby KM, Jiang R. Odd-skipped related 1 (Odd1) is an essential regulator of heart and urogenital development. *Dev Biol.* 2005;288(2):582–594.
8. Dauber A, Stoler J, Hechter E, Safer J, Hirschhorn JN. Whole exome sequencing reveals a novel mutation in CUL7 in a patient with an undiagnosed growth disorder. *J Pediatr.* 2013; 162(1):202-204.
9. Seelow D, Schuelke M, Hildebrandt F, Nürnberg P. HomozygosityMapper-an interactive approach to homozygosity mapping. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(W):593-959.
10. Aerts S, et al. Gene prioritization through genomic data fusion. *Nat Biotechnol.* 2006;24(5):537-544.
11. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 1980;287(5785):795–801.

12. Gao Y, Lan Y, Ovitt CE, Rulang J. Functional equivalence of the zinc finger transcription factors *Osr1* and *Osr2* in mouse development. *Dev Biol.* 2009;328(2):200–209.
13. Mullen RD, Behringer RR. Molecular Genetics of Müllerian Duct Formation, Regression and Differentiation. *Sex Dev.* 2014;8(5):281–296.
14. Zhang Z, et al. A variant *OSR1* allele which disturbs *OSR1* mRNA expression in renal progenitor cells is associated with reduction of newborn kidney size and function. *Hum Mol Genet.* 2011;20(21):4167–4174.
15. Lan Y, Kingsley PD, Cho ES, Jiang R. *Osr2*, a new mouse gene related to *Drosophila* odd-skipped, exhibits dynamic expression patterns during craniofacial, limb, and kidney development. *Mech Dev.* 2001;107(1-2):175–179.
16. Mugford, JW, Sipila, P, McMahon, JA, McMahon, AP. *Osr1* expression demarcates a multi-potent population of intermediate mesoderm that undergoes progressive restriction to an *Osr1*-dependent nephron progenitor compartment within the mammalian kidney. *Dev. Biol.* 2008;324(1):88–98.
17. Prunskaitė-Hyryläinen, R, Skovorodkin, I, Xu, Q, Miinalainen J, Shan J, Vainio SJ. *Wnt4* coordinates directional cell migration and extension of the Mullerian duct essential for ontogenesis of the female reproductive tract. *Hum Mol Genet.* 2016;25(6):1059–1073.
18. Ma, W, et al. Associations of polymorphisms in *WNT9B* and *PBX1* with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome in Chinese Han. *PLoS One.* 2015;10(6):e0130202.
19. Miller, C, Sassoon, DA. *Wnt-7a* maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. *Development.* 1998;125(16):3201–3211.
20. Parr, BA, McMahon, AP. Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires *Wnt-7a*. *Nature.* 1998;395(6703):707–710.
21. Taylor HS, Vanden Heuvel GB, Igarashi P. A conserved Hox axis in the mouse

and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod.* 1997;57(6):1338–1345.

22. Gendron RL, Paradis H, Hsieh-Li HM, Lee DW, Potter SS, Markoff E. Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in Hoxa-11 null mice. *Biol Reprod.* 1997;56(5):1097–1105.

23. Benson GV, Lim H, Paria BC, Satokata I, Dey SK, Maas RL. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development.* 1996;122(9):2687–2696.



#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Em resumo os estudos propostos neste capítulo evidenciaram que:

- Através de sequenciamento exômico amplo seguido por análise genética abrangente foi identificado uma mutação em homozigose no gene *Odd-skipped related 1* gene (*OSR1*), p.V108F em três irmãs apresentaram amenorréia primária por provável alteração na formação dos ductos de Müller (DMs).

- O *Osr1* é expresso em toda a extensão dos DMs e ductos de Wolff (DWs) de embriões com 13,5 dias de gestação (E13,5).

- Os DMs estão ausentes no lado esquerdo e truncados rostralmente no lado direito de E13,5 *Osr1*<sup>-/-</sup> nocautes.

- Após o nascimento, o RNAm de *Osr1* é expresso no útero de camundongos selvagens ao longo de todo o desenvolvimento, com expressão mais acentuada em durante a adenogênese endometrial e o início da puberdade.

- No útero adulto, a proteína *Osr1* é expressa principalmente nas células epiteliais luminais e glandulares do endométrio, como também no epitélio dos ovidutos, sendo observada menor expressão no estroma endometrial.

Através de uma abordagem translacional, demonstramos que *OSR1* é um novo candidato entre os fatores moleculares que modulam a formação e diferenciação de estruturas derivadas dos DMs.

Estudos futuros são necessários para esclarecer os mecanismos de ação do *OSR1* no desenvolvimento e funcionamento do aparelho reprodutor feminino ao longo da vida, dentre eles:

a) Geração e caracterização de modelo de camundongo com mutação encontrada nos pacientes através de *CRISPR/Cas9*.

b) Investigar os possíveis mecanismos de interação entre *Osr1* e outros marcadores conhecidamente relacionados com a formação (*Lhx1*, *Wnt4*, *Wnt9b*) e diferenciação (*Wnt7a*, *Amhr2*, *Hoxa10*, *Wnt5a*) dos ductos de Müller.

c) Análise da morfologia dos ductos de Muller após silenciamento do gene *Osr1* com utilização de siRNA e/ou shRNA em culturas *in vitro* de pregas urogenitais provenientes embriões de camundongos.

## 5 REFERÊNCIAS

AMSTISLAVSKY, S. et al. Reproductive technologies relevant to the genome resource bank in Carnivora. **Reprod Domest Anim**, 2012; 47(1):164-75.

BENSON, G.V. et al. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. **Development**, 1996; 122:2687–2696.

BIASON-LAUBER, A. et al. A WNT4 mutation associated with Müllerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. **N Engl J Med**, 2004; 351:792–798.

CARROLL, T. J. et al. Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. **Dev Cell**, 2005; 9: 283-292.

CHA, J. et al. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. **Nat Med**, 2012; 18:1754–1768.

Cheng, Z. et al. A novel mutation of HOXA10 in a Chinese woman with a Mullerian duct anomaly. *Hum Reprod*, 2011; 26:3197–3201.

DAFTARY, G. S. E TAYLOR, H. S. Endocrine regulation of HOX genes. **Endocr Rev**, 2006; 27:331–355.

DOHR, C. et al. Different antigen expression on Wolffian and Müllerian cells in rat embryos as detected by monoclonal antibodies. **Anatomy and embryology**, 1987;176(2):239-42.

DURRANT, B. S. The importance and potential of artificial insemination in CANDES (companion animals, non-domestic, endangered species). **Theriogenology**, 2009; 71(1):113-22.

EKICI, A. B. et al. HOXA10 and HOXA13 sequence variations in human female genital malformations including congenital absence of the uterus and vagina. **Gene**, 2013; 518:267–272.

GELLERSEN, B. E BROSENS, J. J. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. **Endocrine Reviews**, 2014; 35(6):851–905.

GENDRON, R. L. et al. Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in Hoxa-11 null mice. **Biol Reprod**, 1997; 56:1097–1105.

GRIMBIZIS, G. F. et al. The ESHRE/ESGE consensus on the classification of female genital tract congenital anomalies. **Hum Reprod**. 2013;28(8):2032–2044.

GUIOLI, S. et al. The origin of the Mullerian duct in chick and mouse. **Developmental biology**, 2007;302(2):389-98.

HANSEN, P. J. Current and future assisted reproductive technologies for mammalian farm animals. **Adv Exp Med Biol**, 2014; 752:1-22.

HEIKKILA, M. et al. The partial female to male sex reversal in Wnt-4-deficient females involves induced expression of testosterone biosynthetic genes and testosterone production, and depends on androgen action. **Endocrinology**, 2005; 146: 4016-4023.

JACQUINET, A. et al. Etiologies of uterine malformations. **Am J Med Genet**. 2016;170(8):2141-2172.

KOBAYASHI, A. E BEHRINGER, R. R. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. **Nature Reviews Genetics**, 2003; 4 (12):969-80.

KOMATSU, M. e FUJITA H. Electron-microscopic studies on the development and aging of the oviduct epithelium of mice. **Anat Embryol (Berl)**, 1978; 152: 243-259.

KURITA, T. et al. Epithelial-stromal tissue interaction in paramesonephric (Mullerian) epithelial differentiation. **Dev Biol**, 2001; 240: 194-211.

KURITA, T. Normal and abnormal epithelial differentiation in the female reproductive tract. **Differentiation**, 2011; 82(3): 117–126.

- LAN, Y. et al. Generation of *Osr1* conditional mutant mice. **Genesis**, 2011; 49(5): 419–422.
- LAYMAN, L. C. The genetic basis of female reproductive disorders: etiology and clinical testing. **Mol Cell Endocrinol**, 2013; 370(0): 138–148.
- MASSÉ, J. et al. The developing female genital tract: from genetics to epigenetics. **Int J Dev Biol**, 2009; 53:411–424.
- MERICSKAY, M. et al. *Wnt5a* is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. **Development**, 2004; 131: 2061– 2072.
- MILLER, C. E SASSOON, D. A. *Wnt-7a* maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. **Development**, 1998; 125: 3201–3211.
- MULLEN, R. D. E BEHRINGER, R. R. Molecular genetics of Müllerian duct formation, regression and differentiation. **Sex develop**, 2014 (in press).
- ORVIS, G. D E BEHRINGER, R. R. Cellular mechanisms of Müllerian duct formation in the mouse. **Developmental biology**, 2007;306(2):493-504.
- PARR, B. A. E MCMAHON, A. P. Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires *Wnt-7a*. **Nature**, 1998; 395: 707–710.
- SPENCER, T.E. et al. Comparative developmental biology of the uterus: Insights into mechanisms and developmental disruption. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2012 ;354(1-2):34-53.
- STARK, K. et al. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by *Wnt-4*. **Nature**, 1994; 372: 679–683.
- TAYLOR, H. S. et al. A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the *Hoxa* cluster genes. **Biol Reprod**, 1997; 57:1338–1345.

VAINIO, S. et al. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. **Nature**, 1999; 397: 405-409.

VAN DER HORST, H. P. et al. Interaction between sex hormones and WNT/ $\beta$ -catenin signal transduction in endometrial physiology and disease. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2012; 358: 176-184.

WANG, Q. et al. Odd-skipped related is an essential regulator of heart and urogenital development. **Developmental biology**, 2005; 288(2):582-94.

ZANATTA, A. et al. The role of the Hoxa10/HOXA10 gene in the etiology of endometriosis and its related infertility: a review. **J Assist Reprod Genet**, 2010; 27:701–710.

ZHAO, Y. e POTTER S. S. Functional specificity of the Hoxa13 homeobox. **Development**, 2001; 128: 3197-3207.

## CAPÍTULO II: ESTUDO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DE *MAKORIN RING FINGER 3* (MKRN3) NAS GÔNADAS DE CAMUNDONGOS

### 1 INTRODUÇÃO

O sistema reprodutivo passa por diversas mudanças ao longo da vida pós-natal em mamíferos, desde o período neonatal e infância, até o início da puberdade, vida adulta e senescência. As grandes mudanças observadas nessas fases ilustram a complexidade dos mecanismos reguladores envolvidos na aquisição, manutenção e modificações na capacidade reprodutiva (TENA-SEMPERE E HUHTANIEMI, 2003).

Tradicionalmente, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) produzido nos neurônios hipotalâmicos é considerado o principal regulador da síntese e secreção das gonadotrofinas, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), pela hipófise. Recentemente, outros neuropeptídeos foram identificados com papel crucial na regulação da síntese e secreção de GnRH. A kisspeptina é considerada atualmente um fator estimulatório decisivo para a indução do desenvolvimento puberal e constitui juntamente com a Neuroquinina B (Nkb) e a dinorfina A (Dyn) o mais importante sistema excitatório para os neurônios secretores de GnRH, além de mediar o efeito dos esteroides ovarianos sobre a regulação do pico pré-ovulatório de secreção de LH (D'ANGLEMONT DE TASSIGNY E COLLEDGE, 2010, NAVARRO E TENA-SEMPERE, 2012).

Em 2000, foi descoberto em aves um novo peptídeo hipotalâmico com efeitos inibitórios sobre a secreção de gonadotrofinas induzida pelo GnRH, o hormônio inibidor de gonadotrofinas (GnIH), o qual foi posteriormente denominado *RFamide-related peptide 3* (RFRP3) em mamíferos (TSUTSUI et al., 2000). Evidências de estudos em diferentes espécies de aves e mamíferos tem demonstrado que o efeito do GnIH/RFRP-3 ocorre por intermédio do seu receptor, a proteína G acoplada ao receptor 147 (GPR147), tanto no hipotálamo, onde modula a ativação dos neurônios secretores de GnRH, quanto na hipófise anterior, influenciando diretamente a secreção de gonadotrofinas (TSUTSUI, 2009).

Recentemente, a partir de sequenciamento exômico amplo em indivíduos que apresentaram puberdade precoce central (GnRH-dependente) verificou-se que mutações inativadoras no gene que codifica a proteína *makorin RING-finger protein*

3 (MKRN3) associaram-se ao desenvolvimento puberal precoce em seres humanos. Esse gene é altamente expresso no hipotálamo em desenvolvimento, com redução progressiva ao longo do período pré-puberal (ABREU et al., 2013). O gene MKRN3 sofre *imprinting* materno, portanto, apenas indivíduos que carregam o alelo paterno mutado expressam o fenótipo. As proteínas da família “makorina” apresentam duas ou três cópias de domínios tipo “dedos-de-zinco”: C3H na extremidade N-terminal, seguida por uma configuração Cys-His, um dedo-de-zinco tipo “RING” (C3HC4) e outro domínio final C3H. As regiões “dedos-de-zinco” C3H têm sido implicadas em ligação a RNA, enquanto os domínios dedo-de-zinco tipo “RING” são encontrados na maioria das enzimas E3 ubiquitina-ligases e parecem ser responsáveis por sua atividade. Proteínas da família makorina são bastante conservadas entre as espécies, com alta expressão no sistema nervoso central em desenvolvimento. A proteína MKRN3, entretanto, é conservada apenas em mamíferos marsupiais ou placentários e sua função e mecanismos de ação no controle do desenvolvimento puberal e na reprodução ainda são desconhecidos (JONG et al., 1999).

Nos últimos anos, a caracterização dos efeitos desses diversos neuropeptídeos na regulação do desenvolvimento e função do sistema reprodutivo ao longo da vida tem sido possível em face de inúmeros estudos translacionais, corroborados por experimentação *in vitro* e em modelos animais. O papel central do hipotálamo no controle do desenvolvimento puberal e da função reprodutiva ao longo da vida é bem estabelecido, contudo, os fatores que regulam a atividade neuronal específica de determinados núcleos hipotalâmicos ao longo do desenvolvimento pós-natal e a interação entre eles ainda não são completamente conhecidos. Adicionalmente, o entendimento do papel fisiopatológico de diferentes fatores gonadais na regulação parácrina da gametogênese e na produção de esteroides, bem como na regulação endócrina por retroalimentação negativa ou positiva sobre o hipotálamo ainda é escasso. Sabe-se que as gônadas também têm capacidade de sintetizar vários neuropeptídeos, incluindo GnRH, RFRPs e kisspeptina em ambos os sexos (ANJUM et al., 2012; MEI et al., 2013; WANG et al., 2014; SALEHI et al., 2015). No entanto, os efeitos funcionais diretos desses neuropeptídeos sobre a função gonadal ainda não estão completamente esclarecidos e suas inter-relações funcionais nas gônadas e na secreção de hormônios gonadais foram pouco investigados.

Nesse sentido, a hipótese do presente estudo é que neuropeptídeos hipotalâmicos e outros fatores reguladores da ativação do eixo reprodutivo, incluindo o MKRN3, também se expressem de maneira específica nos diferentes compartimentos celulares gonadais e potencialmente influenciem a regulação da função gonadal ao longo do desenvolvimento.



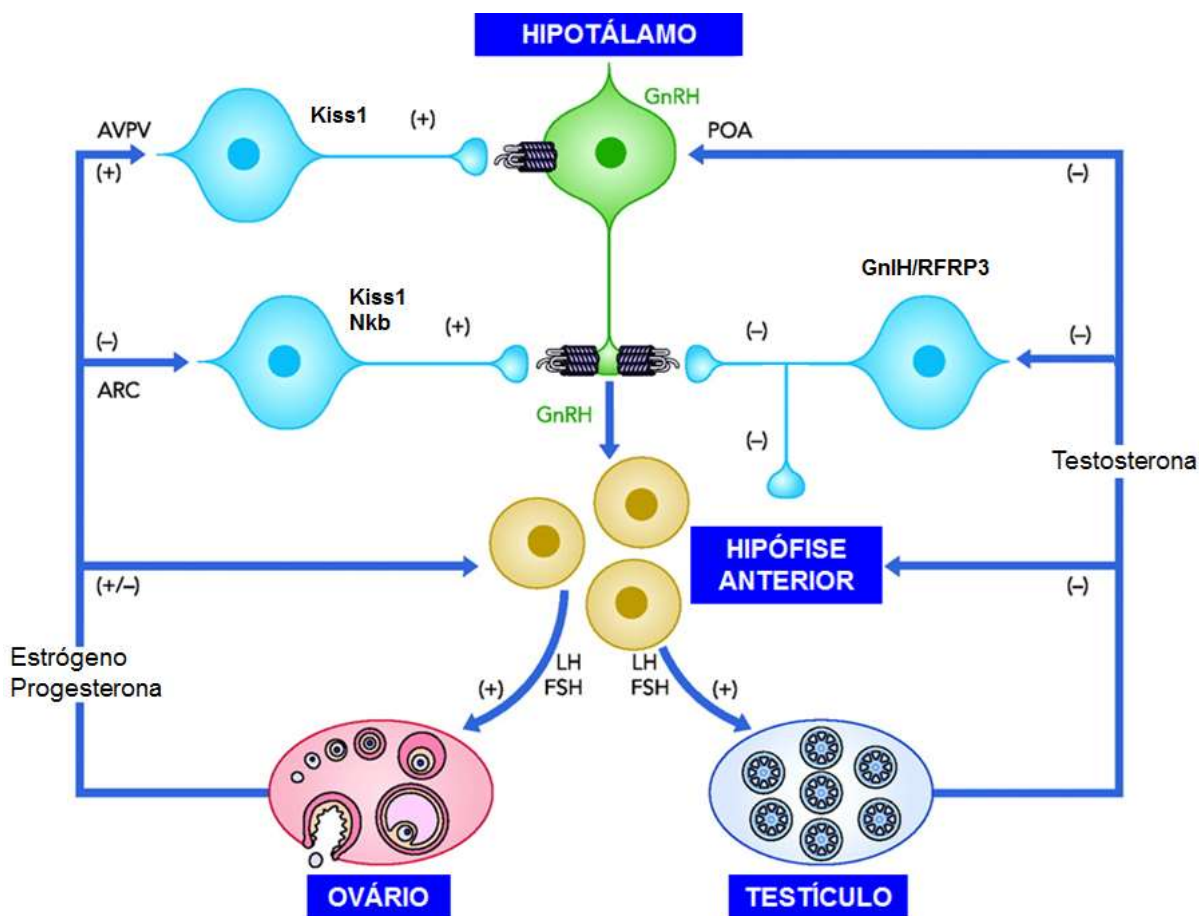
## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CONTROLE NEUROENDÓCRINO DO PROCESSO REPRODUTIVO

#### 2.1.1 Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas (HPG)

O processo reprodutivo é indispensável para a perpetuação das espécies. Como tal, esta função está sob o controle de complexos mecanismos de regulação, os quais são sensíveis a inúmeros fatores endógenos e ambientais, e podem ser alterados ao longo do desenvolvimento pós-natal (TENA-SEMPERE E HUHTANIEMI, 2003).

O controle hormonal da reprodução baseia-se principalmente na interação dinâmica entre sinais provenientes de três grandes fontes: o hipotálamo anterior, onde um pequeno grupo de neurônios sintetizam o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH); a hipófise anterior, que é estimulada por GnRH para sintetizar e liberar gonadotrofinas hipofisárias, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) ; e as gônadas, que, além de produzirem os gametas após o início da puberdade, respondem às ações tróficas de gonadotrofinas com aumento da secreção de esteróides sexuais e outros hormônios. Esses fatores gonadais, por sua vez, atuam sobre o hipotálamo e a hipófise regulando a secreção de GnRH e gonadotrofinas (TENA-SEMPERE E HUHTANIEMI, 2003). Além dos elementos supracitados, recentemente outros neuropeptídeos foram identificados com papel crucial na regulação da síntese e secreção de GnRH, tais como, kisspeptina, neuroquinina B (NKB), dinorfina A (Dyn) e GnIH/RFRP3 (D'ANGLEMONT DE TASSIGNY E COLLEDGE, 2010) (Figura 1).



**Figura 5: O eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG) em mamíferos.** Na puberdade, a secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) estimula a hipófise anterior a sintetizar e liberar as gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH). Estes, por sua vez, atuam sobre as gônadas para promover a formação de gametas e a produção de hormônios esteroides gonadais, que regulam, no hipotálamo e hipófise, a liberação de GnRH, LH e FSH. Neurônios de kisspeptina e neurônios KNDy atuam como condutores da sinalização dos esteroides sexuais sobre a secreção de GnRH. Neurônios de RFRP3 controlam negativamente a secreção de GnRH e/ou LH através de sinalizações provenientes dos esteroides sexuais, e de fatores ambientais e comportamentais. Adaptado de D'ANGLEMONT DE TASSIGNY E COLLEDGE, 2010.

### 2.1. 2 Kisspeptina, Neuroquinina B (NKB) e Dinorfina A (DYN)

A Kisspeptina foi originalmente identificada na biologia do câncer, como produto do gene supressor de metástase, *KISS1*, por isso levou o nome inicial de metastina (OHTAKI et al., 2001). O gene *KISS1* codifica um peptídeo precursor com 145 aminoácidos, que é clivado em uma proteína de 54 aminoácidos chamada

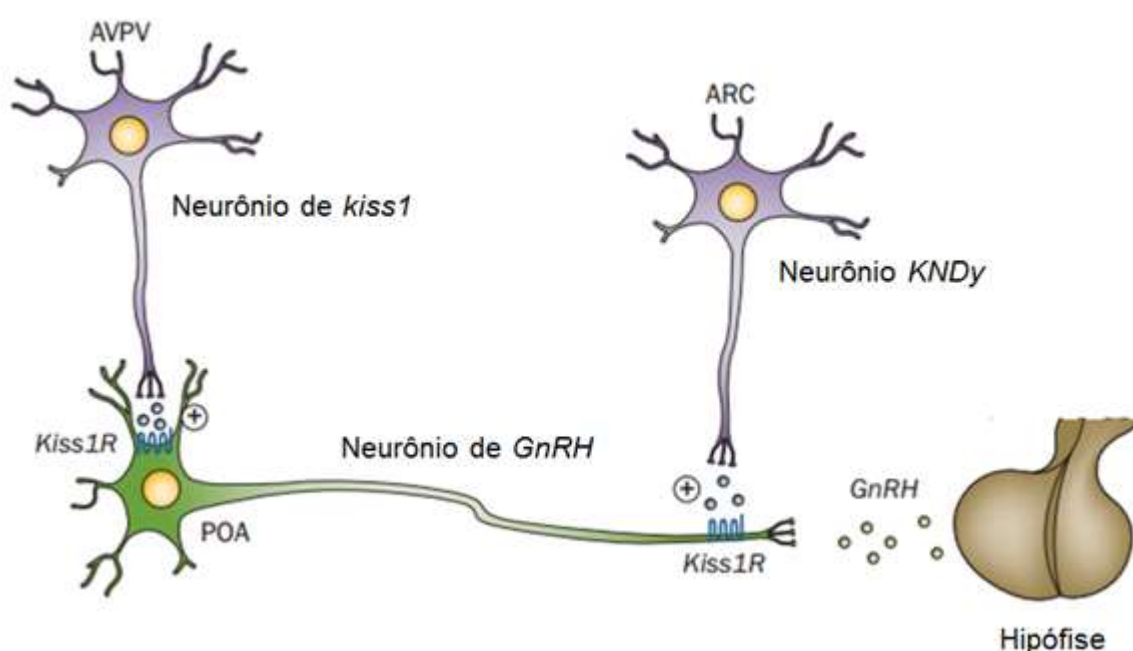
de kisspeptina 54 (KP-54). A KP-54, por sua vez, ainda pode ser clivada em outros peptídeos: KP-14, KP-13, KP-10. Todas essas diferentes formas compartilham da mesma sequência carboxi-terminal de 10 aminoácidos (KOTANI et al., 2001).

Em 2001, a kisspeptina foi identificada como um ligante para a proteína G acoplada ao receptor 54 (GPR54 em espécies de mamíferos / KISS1R para humanos, e Kiss1r para não humanos), que foi descrita pela primeira vez no cérebro de rato e subsequentemente em humanos (KOTANI et al., 2001; MUIR et al., 2001; OHTAKI et al., 2001). Logo após, em 2003, dois estudos clínicos independentes correlacionaram a kisspeptina e seu respectivo receptor ao processo reprodutivo, mostrando que pacientes com mutações no GPR54, com perda de função deste marcador, apresentaram hipogonadismo hipogonadotrófico isolado, com ausência de puberdade e infertilidade. Essas foram as primeiras evidências de que a kisspeptina e seu receptor são essenciais para a normalidade da função reprodutiva (DE ROUX et al., 2003). Desde então, vários estudos em modelos animais e celulares têm buscado entender os papéis fundamentais e a fisiologia do sistema kisspeptina no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. Nesse sentido, atualmente a kisspeptina é considerada o mais potente estimulador natural dos neurônios de GnRH e, portanto, da secreção de gonadotrofinas (D'ANGLEMONT DE TASSIGNY E COLLEDGE, 2010).

Além do papel indispensável na estimulação dos neurônios de GnRH, o sistema kisspeptina também desempenha uma atribuição importante como sensor e transdutor de informação metabólica aos centros reprodutivos, principalmente aos neurônios de GnRH (CASTELLANO et al., 2010). Essa função está alicerçada no fato de neurônios de GnRH não apresentarem receptores para os principais mediadores metabólicos, tais como, leptina e insulina, no entanto, é evidente que o processo reprodutivo, como um todo, é extremamente sensível a mudanças no estado metabólico e nas reservas energéticas. É nesse ponto, que entra o sistema neuronal da kisspeptina, o qual consegue perceber as principais alterações no metabolismo, através de receptores para os principais mensageiros metabólicos supracitados, e transmiti-las ao eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, alterando assim o padrão de secreção de neuropeptídeos no mesmo (ROA E TENA-SEMPERE, 2010; CASTELLANO et al., 2010).

Vários estudos neuroanatômicos em camundongos e ratos têm mostrado que existem duas principais populações hipotalâmicas de neurônios de kisspeptina

descritas no cérebro desses animais: uma no núcleo periventricular anteroventral (AVPV), na área pré-óptica (POA), e outra no núcleo arqueado (ARC), no hipotálamo mediobasal (MBH) (SMITH et al., 2005; CLARKSON et al., 2008). A população de neurônios de kisspeptina no ARC coexpressam dois outros peptídeos, neuroquinina B (Nkb) e dinorfina A (Dyn), sendo chamado esse conjunto de neurônios KNDy (MITTELMAN-SMITH et al., 2012; LEHMAN, et al., 2010) (Figura 2).



**Figura 6: Principais populações hipotalâmicas de neurônios de kisspeptina em roedores.** Os neurônios presentes no núcleo periventricular anteroventral (AVPV), na área pré-óptica (POA) estão envolvidos principalmente no desencadeamento do pico de LH induzido por estrógeno. Os Neurônios de kisspeptina no núcleo arqueado (ARC) coexpressam neuroquinina B (Nkb) e dinorfina A (Dyn) e por esse motivo são chamados de neurônios KNDy, os quais atuam principalmente na regulação da secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Adaptado de NAVARRO E TENA-SEMPERE, 2012.

O papel da sinalização de kisspeptina no controle do início da puberdade foi inicialmente sugerido pela ausência desse período em humanos e ratos com mutações causadoras de inativação no receptor desse neuropeptídeo, GPR54 ou Gpr54, respectivamente. Além disso, o número de neurônios de kisspeptina aumenta, em ambos os sexos, nos núcleos ARC e AVPV durante o início da

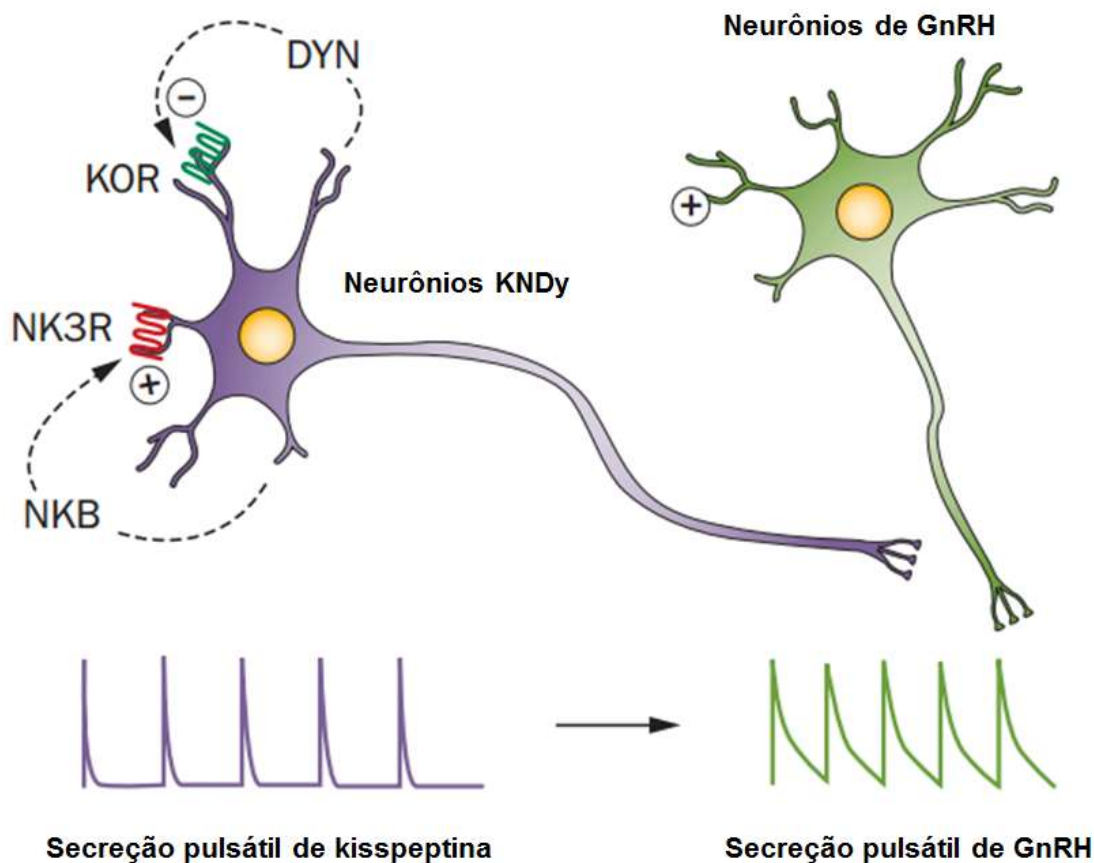
puberdade e amadurecimento puberal (CLARKSON E HERBISON, 2006; NAVARRO et al., 2004). Por outro lado, durante a senescência, os níveis de kisspeptina diminuem levando a uma redução da secreção de GnRH e gonadotrofinas com consequente redução da capacidade reprodutiva (ROA et al., 2008; LEDERMAN et al., 2010).

Durante o período de atividade reprodutiva a quantidade de neurônios de kisspeptina localizados no AVPV é sexualmente dimórfica, com maior número dos mesmos nas fêmeas, quando comparado com os machos (CLARKSON & HERBISON, 2006). Nesse sentido, esses neurônios presentes no AVPV parecem estar envolvidos principalmente no desencadeamento do pico de LH induzido por estrógeno, que acontece durante o proestro do ciclo estral nas fêmeas (CLARKSON et al., 2008; SMITH et al., 2006; DROR et al., 2013). Por outro lado, os neurônios de kisspeptina presentes no ARC, por receberem sinalização negativa dos hormônios produzidos nas gônadas, dentre eles, estrógeno e testosterona, atuam principalmente na regulação da secreção pulsátil de GnRH, o que é importante para a manutenção do período reprodutivo, incluindo a promoção do crescimento e maturação de folículos em desenvolvimento, no ovário, e a produção de espermatozoides pelos testículos (LI et al., 2009).

A Neuroquinina B (Nkb) e a dinorfina A (Dyn), codificadas pelos genes *Tac3* e *Dyn*, respectivamente, têm sido caracterizados como potenciais autoreguladores da secreção de kisspeptina. Análises de expressão demonstraram conclusivamente que a co-localização de kisspeptina, Nkb e Dyn é uma característica específica da população de neurônios de kisspeptina no núcleo arqueado (LEHMAN, et al., 2010). Esses neurônios também sintetizam os receptores de Nkb (Nk3r) e de Dyn (Kor) codificados pelos genes *Tac3r* e *Kor*, respectivamente.

Nesse sentido, estudos têm descrito que a Nkb é capaz de sincronizar e estimular a produção de Dyn pelos neurônios de kisspeptina, a Dyn, por sua vez, reduz a secreção de Nkb por sinalização negativa e isso consequentemente gera pulsos regulares desses neuropeptídeos. Essas mudanças na pulsatilidade de Nkb e Dyn sinalizam, através de diferentes vias, a secreção de kisspeptina e subsequentemente de GnRH (RANCE E BRUCE, 1994; SMITH et al., 2005; NAVARRO et al., 2009) (Figura 3). Além disso, estudos em humanos, têm demonstrado que mutações inativadoras de NKB ou de seu receptor, NK3R, foram

associadas a insuficiência reprodutiva dos indivíduos avaliados (TOPALOGLU et al., 2009; GURAN et al., 2009; GIANETTI et al., 2010).



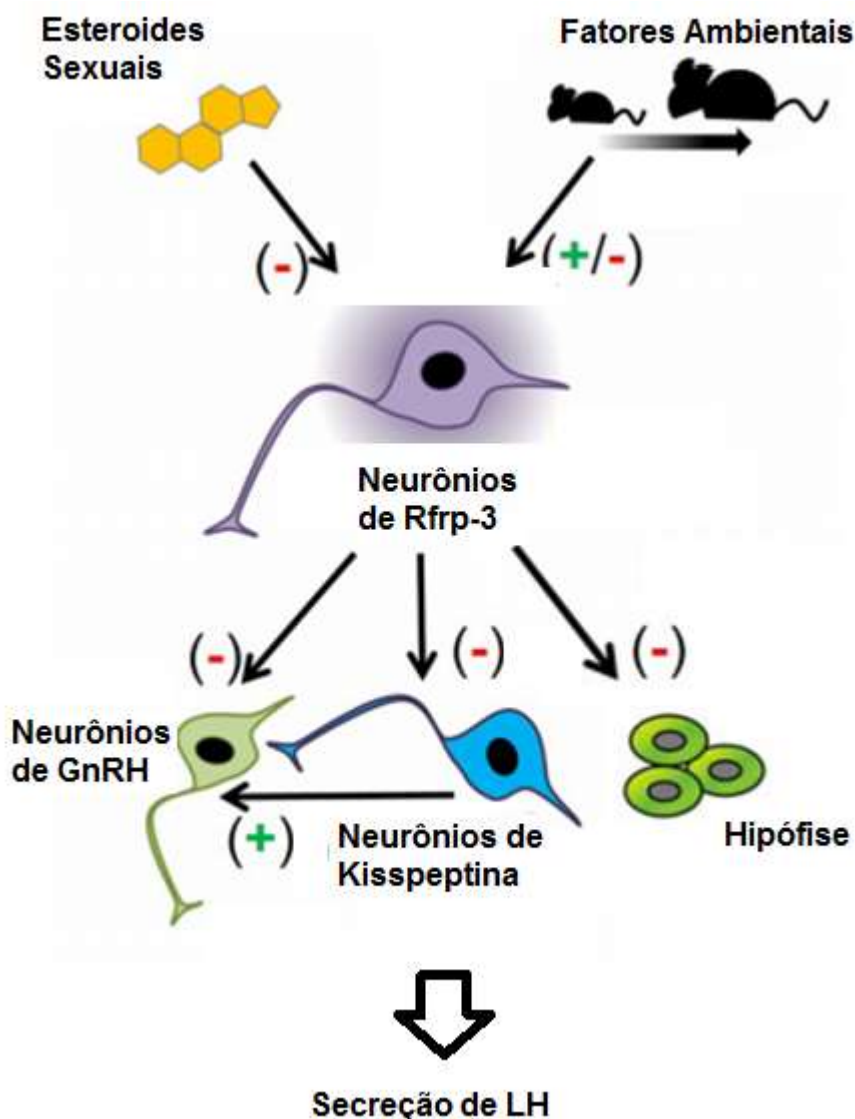
**Figura 7: Influência da neuroquinina B (Nkb) e dinorfina A (Dyn) sobre a secreção de kisspeptina e de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH).** A Nkb é capaz de sincronizar e estimular a produção de Dyn pelos neurônios de kisspeptina, a Dyn, por sua vez, reduz a secreção de Nkb por sinalização negativa e isso conseqüentemente gera pulsos regulares desses neuropeptídeos. Essas mudanças na pulsatilidade de Nkb e Dyn sinalizam, através de diferentes vias, a secreção de kisspeptina e subsequentemente de GnRH. Adaptado de NAVARRO E TENA-SEMPERE, 2012.

A ação direta da Nkb nos neurônios de GnRH não é completamente compreendida. Estudos em roedores mostraram que esses neurônios expressam receptores de Nkb, no entanto, a forma com que esse neuropeptídeo estimula a produção de GnRH ainda é controversa, principalmente entre diferentes espécies. Em roedores a Nkb parece estimular negativamente a secreção de LH (SANDOVAL-GUZMAN et al., 2004; NAVARRO et al., 2009; CORANDER et al., 2010).

### 2.1.3 Hormônio inibidor de gonadotrofinas (GnIH)/RFamide-related peptide 3 (RFRP3)

Em 2000, foi identificado outro neuropeptídeo hipotalâmico, o hormônio inibidor de gonadotrofinas (GnIH), com efeitos inibidores sobre a secreção de gonadotrofinas em codornas japonesas (*Coturnix japonica*) (TSUTSUI et al., 2000). Subsequentemente, evidências de estudos em diferentes espécies de aves e mamíferos têm demonstrado que o efeito do GnIH ocorre por intermédio do seu receptor, a proteína G acoplada ao receptor 147 (GPR147), tanto no hipotálamo, onde modula a ativação dos neurônios secretores de GnRH, quanto na hipófise anterior, influenciando diretamente a secreção de gonadotrofinas. Em mamíferos, os ortólogos do GnIH são denominados peptídeos relacionados à *RFamide* (*RF-amide related peptides* [RFRPs]), os quais pertencem a um grupo de peptídeos que contém uma sequência consensual LPXRF-amide (onde X=L ou Q) em sua extremidade carboxi-terminal (X= L or Q). Dessa forma, em mamíferos, o GnIH foi denominado RFRP3 (TSUTSUI et al., 2009).

Os neurônios de Rfrps estão localizados principalmente na região médio-basal do hipotálamo em mamíferos (YANO et al., 2004; KRIEGSFELD et al., 2006; JOHNSON et al., 2007), e vários fatores parecem ser responsáveis pelo controle da produção de Rfrps nesses neurônios. Os esteroides sexuais são conhecidos por inibirem a expressão de Rfrps, principalmente por meio de vias do estrogênio. Além disso, fatores ambientais e comportamentais, tais como, foto período, interações sociais e condições de estresse, também são capazes de mudarem os padrões de secreção de Rfrps (POLING E KAUFFMAN, 2015; ULLAH et al., 2016). Os neurônios de Rfrp-3 apresentam eferentes que podem regular a secreção de LH, agindo diretamente sobre os neurônios do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e/ou hipófise, ou indiretamente, através dos neurônios de kisspeptina ou por outras populações neuronais, ainda a ser identificadas (Figura 4).



**Figura 8: Representação esquemática dos possíveis mecanismos de ação dos neurônios de RF-amide related peptides (Rfrps) sobre a neurofisiologia de camundongos.** Os esteroides sexuais são conhecidos por inibirem a expressão de Rfrps. Os fatores ambientais e comportamentais também são capazes de mudarem os padrões de secreção de Rfrps. Os neurônios de Rfrp-3 apresentam eferentes que podem regular a secreção de LH, agindo diretamente sobre os neurônios do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e/ou hipófise, ou indiretamente, através dos neurônios de kisspeptina ou outras populações neuronais, ainda a ser identificadas. Adaptado de POLING E KAUFFMAN, 2015.

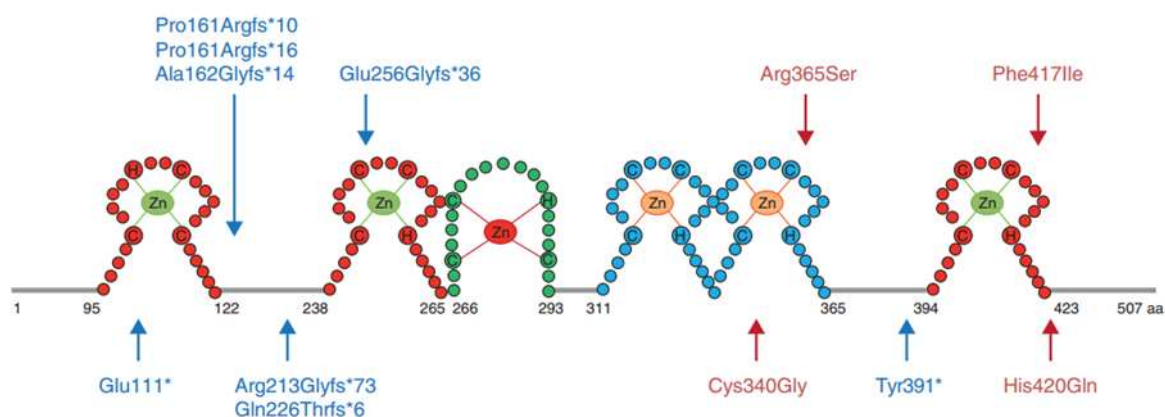
Estudos de imunolocalização e expressão gênica têm mostrado diversas vias de regulação dos neurônios de Rfrp-3, evidenciando seu possível papel na reprodução e em outros processos. Apesar disso, não há atualmente nenhum grande consenso sobre as funções específicas do Rfrp-3 endógeno na fisiologia



reprodutiva. Curiosamente, algumas descobertas sugerem que a sinalização endógena desse neuropeptídeo pode não ser essencial para o início da puberdade, pelo menos em algumas espécies. Dessa forma, novas hipóteses têm sido geradas em relação ao significado funcional do Rfrp-3 para o desenvolvimento e maturação sexual (POLING E KAUFFMAN, 2015).

#### **2.1.4 Makorin RING-finger protein 3 (MKRN3)**

Recentemente, utilizando análise de sequenciamento amplo em casos familiares de puberdade precoce central (CPP), foram identificados defeitos no gene *MKRN3*, que até então, nunca tinha sido relacionado com o eixo HPG. Neste estudo, o *MKRN3* foi identificado como a causa do desenvolvimento sexual precoce em um terço das famílias avaliadas (ABREU et al., 2013). Em 2015, Abreu e colaboradores revisaram 12 distintas mutações com perda de função do *MKRN3* em 30 pacientes (22 meninas e 8 meninos) com CPP em 17 famílias de diferentes etnias (Figura 5). Desde então, outros diversos estudos genéticos têm reforçado a importância do papel do *MKRN3* no início da puberdade em seres humanos, através da caracterização de novas mutações nesse gene (KÄNSÄKOSKI et al., 2015; GRANDONE et al., 2015; NEOCLEOUS et al., 2016; BESSA et al., 2016; STECCHINI et al., 2016, ORTIZ-CABRERA et al., 2017, SIMSEK et al., 2017, BRITO E LATRONICO, 2017, CHRISTOFORIDIS et al., 2017, NISHIOKA et al., 2017, GRANDONE et al., 2017, JEONG et al., 2017, SKORDIS et al., 2017, AYCAN et al., 2018, MACEDO et al., 2018).



**Figura 9: Mutações na proteína MKRN3 identificadas em pacientes com puberdade precoce central (CPP).** Os números correspondem às posições dos aminoácidos na proteína. As mutações em azul são do tipo *frameshift* e as mutações em vermelho são do tipo missense. Adaptado de ABREU et al., 2015.

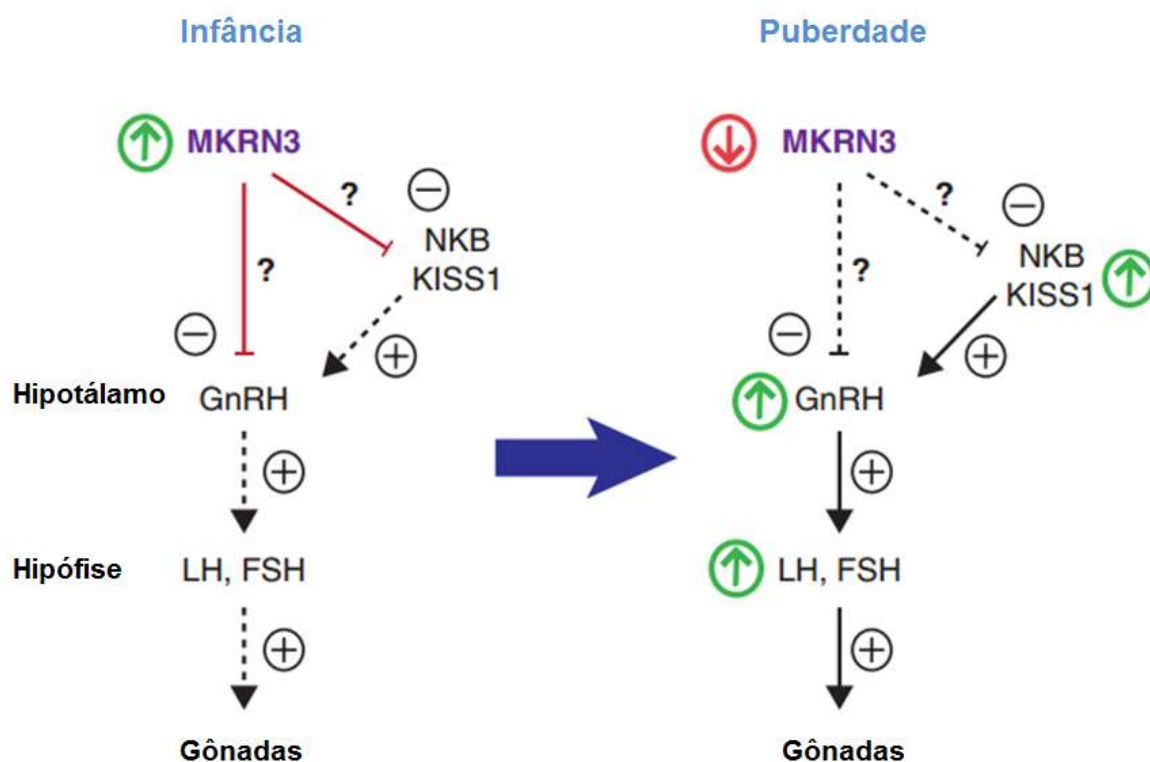
O gene *MKRN3* sofre *imprinting* materno e está localizado em humanos no cromossomo 15q11-13 (cromossomo 7C em camundongo), região que contém um conjunto de genes, que também sofrem *imprinting*, associados a dois diferentes distúrbios neurocomportamentais, as síndromes de Prader-Willi (PWS) e Angelman (AS). No entanto, o papel funcional desse gene nessas desordens permanece desconhecido (JONG et al., 1999; HERSHKO et al., 1999). Além disso, o *MKRN3* é composto por apenas um éxon, não apresentando região intrônica, e provavelmente surgiu por retrotransposição da linhagem germinal do gene *MKRN1*, primeiro ancestral da família makorina. Atualmente, apenas nove loci da família *MKRN* foram identificados distribuídos ao longo do genoma humano, com apenas três genes funcionais - *MKRN1*, *MKRN2* e *MKRN3* - identificadas em vertebrados (GRAY et al., 2000; BOHNE et al., 2010).

As proteínas da família MKRN apresentam duas ou três cópias de domínios “dedos-de-zinco”: C3H na extremidade N-terminal, seguida por uma configuração Cys-His, um “dedo-de-zinco” tipo *RING* (C3HC4) e outro domínio final C3H. As regiões “dedos-de-zinco” C3H têm sido implicadas em ligação a RNA, enquanto os domínios dedo-de-zinco tipo *RING* são encontrados na maioria das enzimas E3 ubiquitina-ligases e parecem ser responsáveis por sua atividade. Proteínas da família MKRN são bastante conservadas entre as espécies, com alta expressão no

sistema nervoso central em desenvolvimento. A proteína MKRN3, entretanto, é conservada apenas em mamíferos marsupiais ou placentários e sua função e mecanismos de ação no controle do desenvolvimento puberal e na reprodução ainda são desconhecidos (JONG et al. 1999).

Além dos achados genéticos em humanos, que sugerem uma relação do gene *MKRN3* com o eixo HPG, principalmente com o início da puberdade, recentemente, outros três estudos mostraram, através de teste de Elisa específico para MKRN3, que os níveis circulantes dessa proteína declinaram durante o período puberal em meninos e meninas saudáveis (HAGEN et al., 2015; VARIMO et al., 2016; BUSCH et al., 2016). Em camundongos, por sua vez, abreu e colaboradores (2013) demonstraram que a expressão de RNAm de *Mkrn3*, no núcleo arqueado (ARC) de machos e fêmeas, diminuiu progressivamente durante o desenvolvimento pós-natal, chegando aos menores níveis antes do início da puberdade, e permanecendo baixos durante a vida adulta.

Até agora, estudos em humano e camundongos sugerem que o MKRN3 atua como um inibidor da secreção de GnRH durante a infância, e que um decréscimo na expressão dessa proteína está associado ao aumento de GnRH, resultando no início da puberdade (ABREU et al., 2015). No entanto, seus mecanismos e as funções exatas ainda não são completamente conhecidos, principalmente nas gônadas (Figura 6).



**Figura 10: Representação esquemática do possível mecanismo de ação do Makorin RING-finger protein 3 (MKRN3).** Estudos em humanos e em camundongos sugerem que o MKRN3 atua como inibidor da secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) durante a infância, e que uma diminuição na expressão dessa proteína está associada com o aumento de fatores estimuladores de GnRH, resultando no início da puberdade. Adaptado de ABREU et al., 2015.

## 2.2 SÍNTESE DE NEUROPEPTÍDEOS PELAS GÔNADAS

Recentemente, alguns estudos têm demonstrado que ambas as gônadas têm a capacidade de sintetizar neuropeptídeos relacionados ao controle hipotalâmico do processo reprodutivo, incluindo GnRH, GnIH e kisspeptina. No entanto, os efeitos funcionais destes marcadores moleculares sobre a função gonadal ainda não estão completamente esclarecidos.

### 2.2.1 Localização e expressão de neuropeptídeos no testículo

Anjum e colaboradores (2012), utilizando camundongos machos da linhagem isogênica Parkes, imunolocalizaram e quantificaram os neuropeptídeos kisspeptina, GnRH, GnIH no testículo desses animais desde o nascimento até a velhice. Observou-se no estudo, que a marcação positiva dos marcadores supracitados, foi localizada principalmente nas células intersticiais durante os diferentes estágios de desenvolvimento, exceto durante a senescência quando a coloração foi observada principalmente nas células germinativas. Quando os mesmos neuropeptídeos foram quantificados, observou-se que os níveis dessas proteínas aumentaram após a puberdade, mantiveram-se elevados durante a maturidade sexual e atingiram o pico na senescência.

Outro estudo, analisando a imunolocalização da proteína kisspeptina e seu respectivo receptor, Kiss1r, no testículo de camundongos da linhagem isogênica ICR ao longo da vida, também demonstrou que esses marcadores estavam presentes principalmente no compartimento intersticial deste órgão em todas as idades avaliadas. Além disso, quando investigou-se a expressão de RNAm dos genes *Kiss1* e *kiss1r*, ao longo do desenvolvimento, no mesmo modelo animal, observou-se que os níveis de RNAm de *Kiss1* foram quase indetectáveis na 2ª e 3ª semanas de vida, aumentaram expressivamente durante o início da puberdade, na 4ª semana de vida, e mantiveram-se elevados durante a idade reprodutiva e senescência. Os níveis de RNAm de *Kiss1r*, por sua vez, não apresentaram alteração e permaneceram elevados durante todas as fases avaliadas (WANG et al., 2014).

Da mesma forma, Mei e colaboradores (2014), utilizando camundongos adultos selvagens e mutantes (*kiss -/-*), demonstrou que a kisspeptina foi localizada nas células de Leydig na linhagem selvagem, no entanto, nos animais nocaute essa proteína não foi encontrada, como esperado.

Corroborando com os dados anteriormente citados, em outro estudo, onde foi utilizado camundongos da linhagem C57BL/6, observou-se que a proteína kisspeptina também foi localizada nas células de Leydig do testículos dos animais avaliados. Além disso, quando a expressão de RNAm de *kiss1* foi analisada no testículo de animais adultos em comparação com outros tecidos do sistema reprodutivo, demonstrou-se que a expressão desse marcador foi 17 vezes maior na gônada quando comparado com o hipotálamo. Quando o RNAm de *Kiss1* foi

avaliado ao longo do desenvolvimento, o mesmo não foi detectado no início da vida, aos 7 dias de idade, com progressivo aumento nas idades subsequentes e, incremento substancial, aos 28 dias de idade, no início da puberdade (SALEHI et al., 2015).

Em primatas, por sua vez, Irfan e colaboradores (2016) demonstraram que a proteína kisspeptina foi localizada, assim como em camundongos, nas células de Leydig, no entanto, seu receptor, KISS1R, foi expresso principalmente nas células de Sertoli.

Desde de que foi descrito, o *Mkrn3* tem sido descrito como ubiquamente expresso, com os mais altos níveis de expressão no testículo humano adulto (JONG et al., 1999). No entanto, é completamente desconhecido se essa proteína desempenha qualquer papel funcional na regulação da função gonadal, bem como, o seu padrão de expressão em ambas as gônadas ao longo do desenvolvimento pós-natal.

### **2.2.2 Localização e expressão de neuropeptídeos no ovário**

Assim como o testículo o ovário também tem a capacidade de sintetizar alguns neuropeptídeos hipotalâmicos relacionados ao processo reprodutivo, utilizando ratas da linhagem Sprague–Dawley, demonstraram que a proteína kisspeptina e seu receptor *Gpr54* foram localizados no ovário desses animais, principalmente nas células da teca e também, com menor intensidade de marcação, nas células da granulosa do mesmo tecido. Em humanos, resultados semelhantes foram encontrados, onde houve imulocalização da kisspeptina restritamente nas células da teca esteroidogênicas e em corpus lúteo maduros (GAYTAN et al., 2009).

Por outro lado, diferente dos estudos anteriores, a avaliação de expressão de RNAm de *KISS1* e *KISS1R* em seres humanos, mostrou que esses genes também são expressos nas células da granulosa do ovário de mulheres, em ambos os compartimentos, mural e cumulus (GARCÍA-ORTEGA et al., 2014).

Em outro estudo, utilizando ratas Wistar, foram identificadas expressão de RNAm de *Tac3* e *Tacr3*, genes que codificam a proteína neuroquinina B e seu receptor, respectivamente, no ovário desses animais (LOFFLER et al., 2004). Em humanos, por sua vez, esses genes também foram expressos nas células da

granulosa do ovário de mulheres, em ambos os compartimentos, mural e cumulus (GARCÍA-ORTEGA et al., 2014).

Como visto nos estudos supracitados, os neuropeptídeos hipotalâmicos relacionados ao controle do processo reprodutivo também são sintetizados nas gônadas de ambos os sexos, no entanto, o padrão de expressão e localização dessas proteínas ainda é contraditório, principalmente entre diferentes espécies. Além disso, o papel e os mecanismos pelos quais esses neuropeptídeos interferem na função dos tecidos gonadais ainda são incompletamente compreendidos.

### 2.2.3 Efeitos de neuropeptídios na função gonadal

Alguns estudos têm buscado esclarecer o papel funcional e as possíveis interações de neuropeptídios hipotalâmicos nas gônadas, em ambos os sexos. Nesse sentido, Anjum e colaboradores (2012) demonstraram que a administração por 15 dias de altas doses (2µg/dia) de GnRH agonista ([DTrp6, Pro9-NEt] GnRH), em camundongos Parkes com 28 dias de idade, aumentou a expressão das proteínas GnRH-R e P450 SCC no testículo desses animais. Ainda no mesmo estudo, o tecido testicular de animais adultos foi cortado (aproximadamente 10 mg por pedaço) e cultivado por 24 horas na presença de GnRH em baixas (1ng/mL) e altas (10ng/mL) doses e foram analisadas a expressão da proteína GnRH-R. Os resultados mostraram que o tratamento com GnRH diminuiu, dependente da dose, a expressão da proteína GnRH-R no tecido testicular em cultura em comparação com o controle.

Outro estudo, avaliou o efeito do tratamento com LH (0 ng/mL, 100 ng/mL), kisspeptina 10 (0µM, 1µM, 5µM, 10µM), ou antagonista de kisspeptina, *peptide 234* (0µM, 1µM, 5µM, or 10µM), por 4 ou 24 horas, sobre a produção de testosterona, pela cultura primária de células de Leydig provenientes de testículos de camundongos ICR adultos. Observou-se, como esperado, que o tratamento com LH aumentou a produção de testosterona pelas células de Leydig, no entanto, a cultura conjunta com kisspeptina 10 e o antagonista *peptide 234* não produziu maiores níveis de testosterona, em ambos os tempos analisados (WANG et al., 2014).

E por fim, Salehi e colaboradores (2015) demonstraram que camundongos machos injetados com GnRH agonista (dose única subcutânea de 0.2 ng/g de peso) ou com hCG (dose única intraperitoneal de 10 IU) apresentaram aumento da expressão testicular de RNAm de *Star* e *Kiss1*, no entanto, quando os mesmos

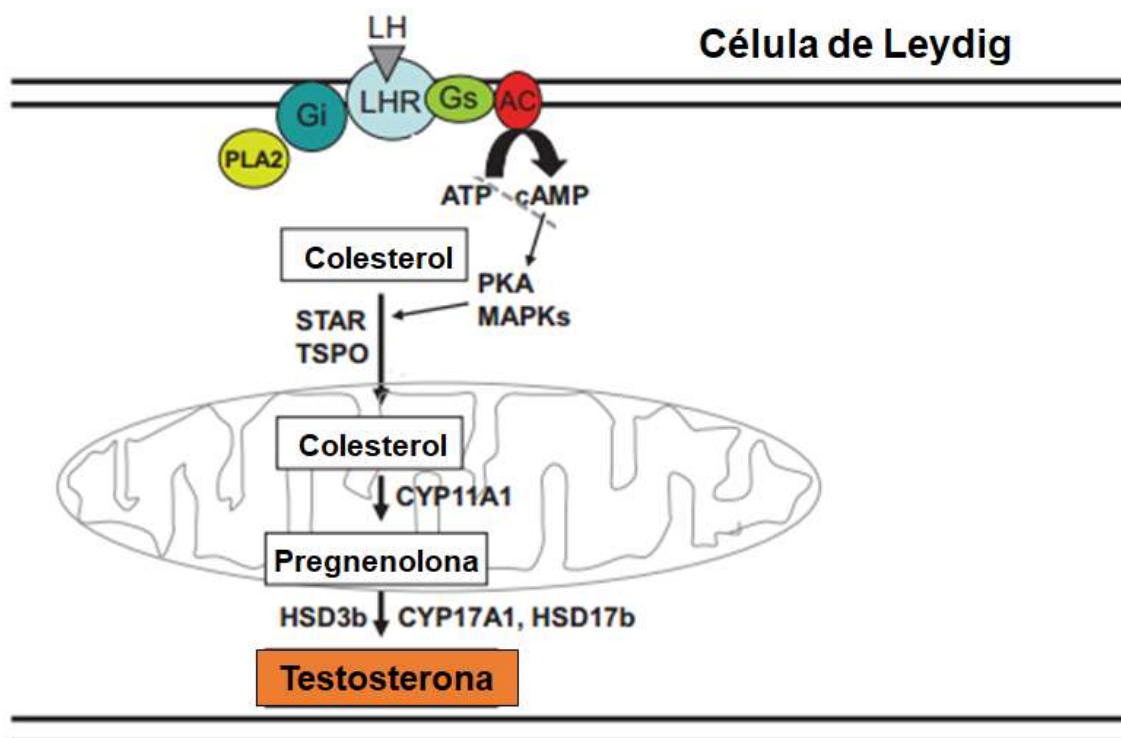
animais receberam testosterona (intraperitoneal de 0.5 mg/10g/d), por três consecutivos dias, a expressão (RNAm) dos genes supracitados diminuiu nos testículos analisados. Ainda no mesmo estudo, após tratamento com LH (20 ng/mL, por 3, 6 ou 18 horas) da cultura primária de células de Leydig, provenientes do testículo de animais adultos, observou-se, da mesma forma que nos animais, aumento, tempo dependente de tratamento, da expressão de RNAm de *Star* e *Kiss1*.

### 2.3 GONADOTROFINAS E OS COMPARTIMENTOS TESTICULARES

As gonadotrofinas FSH e LH são essenciais como reguladores da função ovariana e testicular. Nos homens, LH estimula a produção de testosterona pelas células de Leydig (CL), que por sua vez exerce ações sexuais e anabólicas, e além disso participa na manutenção da espermatogênese por sua ação parácrina em células de Sertoli (CS). O FSH, por sua vez, estimula a proliferação de CS no período pré puberal, as quais tem um papel importante no controle endócrino e parácrino da espermatogênese. CL e SC estão localizadas em dois diferentes compartimentos testiculares, interstício e túbulos seminíferos, respectivamente. Apesar da separação anatômica, esses dois grupos celulares interagem entre si para que ocorra a produção espermática através dos processos de esteroidogênese e gametogênese (HUHTANIEMI, 2002; SHARP et al., 2003).

Nos testículos adultos, a produção de testosterona pelas CL depende da secreção pulsátil de LH pela hipófise na circulação periférica. Quando o LH se liga no seu receptor (LHR) na membrana das CL, isso resulta na ativação da adenilato ciclase, com subsequente aumento da formação de AMPc intracelular e fosforilação de proteínas importantes para a cascata esteroidogênica. A estimulação aguda das CL pelo LH resulta na transferência de colesterol para o interior das mitocôndrias através das ações da proteína reguladora esteroidogênica (STAR) em conjunto com outras proteínas. Na membrana mitocondrial interna, o colesterol é convertido em pregnenolona pela enzima de clivagem do citocromo P450 (CYP11A1) e a pregnenolona, que por sua vez, é convertida em testosterona por enzimas presentes no retículo endoplasmático liso, tais como, 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (HSD3b), 17 $\alpha$ -hidroxilase/17,20 liase (CYP17A1) e 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 3 (HSD17b) (Figura 7) (PAYNE E HALES, 2004, MIDZAK et al., 2011; AGHAZADEH et al., 2015, BEATTIE et al., 2015).





**Figura 11: Esteroidogênese nas células de Leydig (CL).** O hormônio Luteinizante (LH) se liga no seu receptor (LHR) na membrana das CL, isso resulta na ativação da adenilato ciclase, com subsequente aumento da formação de AMPc intracelular e fosforilação de proteínas importantes para a cascata esteroidogênica. A estimulação aguda das CL pelo LH resulta na transferência de colesterol para o interior das mitocôndrias através das ações da proteína reguladora esteroidogênica (STAR) em conjunto com outras proteínas. Na membrana mitocondrial interna, o colesterol é convertido em pregnenolona pela enzima de clivagem do citocromo P450 (CYP11A1) e a pregnenolona, que por sua vez, é convertida em testosterona por enzimas presentes no retículo endoplasmático liso, tais como, 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (HSD3b), 17 $\alpha$ -hidroxilase/17,20 liase (CYP17A1) e 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 3 (HSD17b). Adaptado de WANG et al., 2017.

As células de Sertoli, durante e logo após a puberdade, desempenham um papel crítico no processo de espermatogênese. Essas células são conhecidas como "células de enfermagem" que são responsáveis pelo suporte nutricional e energético no desenvolvimento das células germinativas. Adicionalmente, as CS formam conexões umas com as outras e dividem o epitélio germinativo em compartimentos basal e luminal, formando a barreira hematotesticular, para que as células germinativas sejam protegidas da difusão de substâncias agressivas ao processo de gametogênese (ROBINSON E FRITZ, 1981; MRUK E CHENG, 2004).

FSH atua como o fator endócrino predominante responsável pela regulação da função das CS. Nos testículos, as CS expressam, exclusivamente, os receptores de FSH (FSHR), que são necessários para a proliferação adequada das CS. A

espermatogênese depende de um nível intratesticular apropriado de testosterona. Dessa forma, as CS, mas não as células germinativas, expressam o receptor androgênico (AR), indicando que essas células medeiam os efeitos da testosterona no epitélio seminífero. O AR é necessário para o correto funcionamento da barreira hematotesticular, bem como para o desenvolvimento normal das células germinativas. Portanto, as CS têm papéis cruciais na regulação autócrina e/ou parácrina da espermatogênese. Além disso, sobre o efeito de FSH as CS produzem substâncias tais como, hormônio anti-Mülleriano (AMH) e inibina B, os quais são importantes para o desenvolvimento testicular and feedback negativo sobre o eixo reprodutivo central (HOLSTEIN, 2003; PETERSEN E SODER, 2006).

Apesar de bem estabelecido o processo de como o LH e FSH atuam nas CL e CS, respectivamente, para que ocorra a produção de testosterona e gametas, outras vias autócrinas e/ou parácrinas testiculares, com participação de diferentes proteínas e fatores moleculares na função do testículo permanecem incompletamente compreendidas. Nesse sentido, a hipótese do presente estudo é que neuropeptídeos hipotalâmicos e outros fatores reguladores da ativação do eixo reprodutivo, incluindo o MKRN3, também se expressem de maneira específica nos diferentes compartimentos celulares gonadais e potencialmente influenciem a regulação da função gonadal ao longo do desenvolvimento.

Os objetivos, métodos, resultados e discussão do presente capítulo foram apresentados abaixo no Manuscrito 2.

### 3 MANUSCRITO 2

#### **Mkrn3 expression in mice testis predominates in Leydig cells, increases after puberty and is responsive to LH/hCG receptor activation**

Sidney A. Pereira, Michella S. Coelho, Fernanda C. B. Oliveira, Carine Royer, Francisco A. R. Neves and Adriana Lofrano-Porto

Molecular Pharmacology Laboratory, Faculty of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Brazil.

**Disclosure Statement:** The authors have nothing to disclose.

## ABSTRACT

Recently, several studies have shown that both gonads have the ability to synthesize neuropeptides. Makorin RING-finger protein 3 (MKRN3) is another factor recently related with the right operation of the hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis. So far, studies in humans and mice support this protein as the main inhibitor of GnRH secretion during prepubertal years, and its loss of function is well established as the main cause of precocious puberty in humans. However, its mechanisms and exact functions are still unknown. In the present study, we comparatively investigated the behavior of *Mkfn3* expression in the hypothalamus *versus* male and female gonads. We also addressed the temporo-spatial expression pattern of this protein during sexual development, and whether it is regulated in the functional testicular compartments by gonadotropins. Quantification by qPCR showed that *Mkfn3* mRNA levels was detected in testes and ovaries of wild-type mice at all ages evaluated, however, the pattern of *Mkfn3* expression across lifespan differed between male and female gonads. Interestingly, *Mkfn3* expression was highest by PN28 to PN35 in the testes, whereas it reached the nadir at the same postnatal ages in the ovaries. Moreover, X-gal staining of testes sections from adult *Mkfn3*-LacZ reporter mice showed that *Mkfn3* is expressed mainly in the interstitial compartment, specifically in Leydig cells, but was also mildly detected in the seminiferous tubules. *In vitro* and *in vivo* studies demonstrated that the *Mkfn3* mRNA levels increased in hCG-treated Leydig cells primary cultures. Furthermore, the acute administration of LHRH agonist in adult wild-type mice increased *Mkfn3* expression in testes and the inhibition of the HPG axis, by chronic administration of LHRH agonist, leads to the opposite effect. Finally, the rescue of *Mkfn3* expression was observed in the group of animals that received hCG injection after completing the HPG downregulation phase. Taken together, our developmental expression analyses, *in vitro* and *in vivo* studies showed that *Mkfn3* is produced in the testis, predominantly in the Leydig cells, and that its mRNA expression increases after puberty and is responsive to LH/hCG receptor activation.

## Introduction

Traditionally, gonadotrophin releasing hormone (GnRH) produced in hypothalamic neurons is considered the main regulator of the synthesis and secretion of gonadotrophins, follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), by the pituitary gland. Recently, other neuropeptides were identified as crucial in the regulation of GnRH synthesis and secretion. Among them, Kisspeptin (Kiss1) is currently considered a decisive stimulatory factor for the induction of pubertal development and, together with Neurokinin B (Nkb/TAC3) and Dynorphin A (Dyn), constitute the most important excitatory system for GnRH secreting neurons besides mediating the effect of ovarian steroids on the regulation of the pre-ovulatory LH secretion peak. Kisspeptin, Nkb and Dyn are all secreted by a specialized neuronal population, known as Kndy neurons, located upstream GnRH neurons in the arcuate (ARC) and anteroventral periventricular (AVPV) hypothalamic nuclei in mice. (Navarro and Tena-Sempere, 2012). In addition, a hypothalamic neuropeptide with inhibitory effects on the secretion of gonadotropins induced by GnRH has been discovered in birds, and thereby was named gonadotropin-inhibiting hormone (GnIH) or RFamide-related peptide 3 (Rfrp3), in mammals. However, some controversy still exists regarding Rfrp3 roles in different mammals, including humans. (Tsutsui et al., 2000; Lima et al., 2014).

Recently, through exome sequencing analysis in individuals with familial GnRH-dependent or central precocious puberty (CPP), inactivating mutations in the gene encoding makorin RING-finger protein 3 (MKRN3) have been discovered and associated with early pubertal development in humans (Abreu et al., 2013). *MKRN3* is located on the long arm of chromosome 15, in the Prader–Willi syndrome (PWS) critical region and is maternally imprinted, therefore, only individuals carrying the mutated paternal allele express the phenotype. The proteins of MAKORIN family have two or three copies of zinc finger domains: C3H at the N-terminus extremity followed by a Cys-His configuration, RING zinc finger (C3HC4) and another C3H final domain. The zinc finger regions C3H have been implicated in RNA binding, while RING zinc finger domains are found in most E3 ubiquitin ligases enzymes and appear to be responsible for their activity. Proteins of the MAKORIN family are conserved among species, with high expression in the developing central nervous system.

*MKRN3* is ubiquitously expressed in adult human tissue, with the highest expression levels in the testis, however, its function and mechanisms of action in the control of pubertal development and reproduction are still unknown (Jong et al., 1999).

The central role of the hypothalamus in the control of pubertal development and reproductive function is well established. However, the pathophysiological roles of different gonadal factors in the paracrine regulation of gametogenesis and/or in the production of steroids remain poorly explored. Similarly, the pathways mediating neuroendocrine feedback signals at the level of the hypothalamus are still largely unknown. Recent studies in rodents, in nonhuman primates and in humans have shown that the gonads also have the ability to synthesize neuropeptides, including GnRH and RFRPs (Anjum et al., 2012), kisspeptin and its receptor (Gaytan et al., 2009; Mei et al., 2014; Zhou et al., 2014; Wang et al., 2014; Salehi et al., 2015; Irfan et al., 2016), neurokinin b and its receptor (Loffler et al., 2004; Garcia-ortega et al., 2014) and *MkRN3* (Jong et al., 1999). However, the functional effects of these neuropeptides on gonadal function have not yet been fully understood.

We therefore aimed to investigate the temporo-spatial expression pattern of *MkRN3* in mice gonads across different stages of reproductive development. Since our initial results supported a sex-specific pattern of *MkRN3* expression in the male gonad, we further investigated its expression in Sertoli and Leydig cells under selective gonadotropic stimulation.

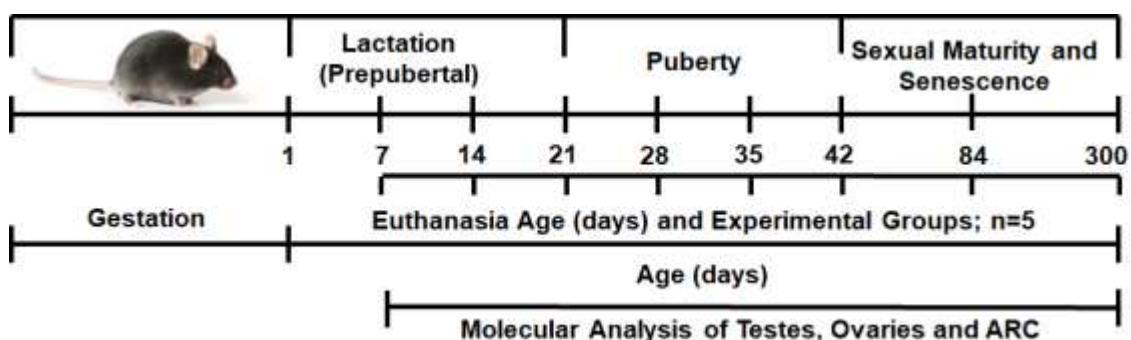
## Material and Methods

### *Study approval*

All procedures were conducted in accordance with the recommendations of the National Institutes of Health's Guide for the Health and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, 1996) and were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the University of Brasilia (Approval Number: 118455/2014). Mice were housed in animal facility of the Faculty of Health Sciences, University of Brasilia, 5 animals per cage, at 25°C, with a 12h light/dark cycle and free access to control diet and water.

### *Experimental design and mouse models*

Initially, to characterize the temporal expression pattern of *Mkfn3*/*Mkfn3* in the HPG axis across different stages of development we investigated mRNA and protein levels in testes, ovaries and ARC from wild-type C57BL/6 mice at postnatal days (PND) 7, 14, 21 (prepubertal), 28, 35, 42 (puberty), 84 (sexual maturity) and 300 (senescence) (n=5 animals per group) (Supplemental Figure 1). Additionally, to validate our *Mkfn3* protein expression assay, *Mkfn3* knockout mice generated by selective ablation of this gene only in the paternal allele (*Mkfn3*<sup>+/-</sup>) or by biallelic ablation (*Mkfn3*<sup>-/-</sup>) were used as controls in the western blots.



**Supplemental Figure 1. Age of euthanasia and analysis of the gonads of mice in different stages of development.** Characterization of the temporal expression pattern of *Mkfn3*/*Mkfn3* in the HPG axis across different stages of development in testes, ovaries and ARC from wild-type C57BL/6 mice at postnatal days (PND) 7, 14, 21 (prepubertal), 28, 35, 42 (puberty), 84 (sexual maturity) and 300 (senescence).

Then, we determined *Mkrn3* spatial localization in the testis, by using adult *Mkrn3*-*LacZ* reporter mice, which were generated by the insertion of a *LacZ* gene in frame with the coding exon of *Mkrn3* through homologous recombination in ES cells, in such a way that *Mkrn3* protein expression is not affected. In this experiment, sections from wild-type testes were used as negative controls.

All genetically engineered mice were kindly provided by Dr. Ursula Kaiser, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, specifically for this study.

To investigate whether *Mkrn3* expression is influenced by selective gonadotropic stimulation of the two functional compartments in the testis, we used both *in vitro* and *in vivo* experimental designs. We first established Sertoli and Leydig primary culture cell lines and evaluated *in vitro Mkrn3* mRNA expression after administration of hCG or FSH to the cell cultures. Then, we addressed testicular *Mkrn3* gene expression *in vivo*, after acute or chronic LHRH agonist administration in adult male wild-type mice. Acute administration of LHRH agonist is expected to elicit a peak of LH secretion after two hours, while prolonged (15-days) daily administration induces downregulation of pituitary GnRH receptors and inhibition of the pituitary-gonadal axis. Mice submitted to chronic LHRH treatment were subsequently treated with a single dose of hCG or FSH to address selective gonadotropin effect on testicular *Mkrn3* expression.

#### *Primary Sertoli and Leydig cell isolation and characterization*

Primary cultures of testicular Sertoli and Leydig cells were obtained according to previously described methods (Royer et al., 2012 and Bois et al., 2010) with some modifications. Briefly, testes of PND28 or PND35 mice were excised and decapsulated in culture medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F-12 1:1) with L-glutamine, HEPES 15 mM, gentamicin 0.02 g/L and Dnase 25µg/mL. Testes were then cut into small fragments and digested by collagenase (0.05 mg/mL, Sigma Aldrich) plus BSA 1% and Dnase 25µg/mL at 37°C with shaking for 15 minutes. The solutions were settled for 2 minutes and the supernatant was transferred to a



new tube. The Leydig cells were pelleted from the supernatant by centrifugation at 2000 rpm for 5 minutes and then resuspended in DMEM/F12, with L-glutamine, HEPES 15 mM and gentamicin 0.02 g/L supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) and cultured in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>:95% air at 37°C. The seminiferous tubes were then digested by hyaluronidase (0.05 mg/mL) plus BSA 1% and Dnase 25µg/mL at 37°C with shaking for 30 minutes. After several centrifugations at 1000 rpm for 2 minutes, the Sertoli cells were plated in the same medium and conditions used for Leydig cells. In both Sertoli and Leydig cultures the medium were changed after 24 hours to remove the remaining germ cells and non-adherent cells. After 7 days of culture each primary cell lineage were characterized by the expression of their specific genes, such as *Fshr* and *Wt1* in Sertoli cells and *Lhr* in Leydig cells.

#### *In vitro studies*

The isolated primary Leydig and Sertoli cells were plated in a 6-well culture plate in medium supplemented with 10% of FBS. After 7 days, when the cells reach 90-95% of confluence, the primary lineages were stimulated with vehicle or hCG (0.03 IU/mL, Choriomon-M, Meizler UCB Biopharma S.A.) or FSH (50 ng/mL, Gonal-F, Merck Senoro) for 4 hours in medium without FBS. By the end of treatment, cells were harvested for total RNA isolation. All experiments were performed with cells isolated from 5 different animals.

#### *In vivo studies*

Adult wild-type male mice were used for *in vivo* studies and three treatment protocols were performed: a) First, animals were acutely treated with a single intramuscular injection of vehicle (n=5) or LHRH agonist (Neo Decapeptyl, Ache Laboratory n=5, 5µg/animal, intramuscular) and mRNA expression was evaluated 2 after; b) Subsequently, mice were chronically treated with vehicle (n=5) or LHRH agonist (n=5, 5µg/animal/day, intramuscular) for 15 days; c) Finally, other males that received LHRH agonist for 15 days were injected with a single dose of vehicle (n=5) or hCG (10 IU, intramuscular) or FSH (4 IU, subcutaneously) for two hours. In the end of all three treatment

protocols, animals were euthanized, testes were collect, snap-frozen on liquid nitrogen and stored at -80°C for mRNA expression analysis.

### *RNA isolation, cDNA synthesis, and quantitative real-time PCR analysis*

Total RNA male and female gonads, ARC and primary Sertoli and Leydig cells were extracted by TRIzol reagent (Invitrogen, California, US) following the manufacturer's protocol. RNA amount and purity were checked by a spectrophotometer (NanoVue Plus, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK). RNA was subsequently treated with DNase I (Sigma-Aldrich) to avoid genomic DNA contamination. Reverse transcription (RT) and quantitative real time PCR (qPCR) were carried out with 5 ng of total RNA using Power SYBR1 Green RNA-toCT™ 1-Step kit (Applied Biosystems, Foster City, US), along with (5 pmol/μL) primers, and were performed in an AB7500 PCR machine (Applied Biosystems, Foster City, US). Relative mRNA levels were measured using *Gapdh* as a reference gene and calculated by the comparative threshold cycle (Ct) method, according to the formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Ref.). Oligonucleotides sequence used are shown in supplemental table 1.

**Supplemental Table 1:** Oligonucleotides sequence used quantitative real-time PCR analysis.

<b>Gene</b>	<b>Oligonucleotide Sequence (5'-3')</b>	<b>Product (bp)</b>	<b>Length</b> <b>Genbank access</b>
<i>Mkx3</i>	Forward: GGAGGGGATGAGCCAGAAAG Reverse: TGCCAGTATGCGCTTGATGA	156	NM_011746.2
<i>Fshr</i>	Forward: TACACAACGTGTCATTCAACGG Reverse: TGGGCAGGGAATAGACCTTTG	150	<u>NM_013523.3</u>
<i>Lhr</i>	Forward: CTCGCCCGACTATCTCTCAC Reverse: ACGACCTCATTAAGTCCCCTG	77	<u>XM_011246310.2</u>
<i>Cyp17a1</i>	Forward: GCCCAAGTCAAAGACACCTAAT Reverse: GTACCCAGGCGAAGAGAATAGA	159	<u>NM_007809.3</u>
<i>Amh</i>	Forward: TGGCTGAAGTGATATGGGAGC Reverse: TAGCACCAAATAGCGGGTGTC	191	<u>NM_007445.2</u>
<i>Inhb-b</i>	Forward: CTTCGTCTCTAATGAAGGCAACC Reverse: CTCCACCACATTCCACCTGTC	166	<u>NM_008381.4</u>
<i>Wt1</i>	Forward: GGGTCCTCGTGTGTTGAAGGAA Reverse: GAGAGCCAGCCTACCATCC	128	<u>NM_144783.2</u>

### *Western blot*

Total proteins were extracted from testes of wild type, Mkrn3<sup>+/-</sup> or Mkrn3<sup>-/-</sup> mice using RIPA buffer. After quantification, 10µg of soluble proteins were separated by SDS-PAGE on 10% polyacrylamide gel under reducing conditions at 4°C and constant voltage (100V). Proteins were then electrotransferred for 90 min, at 4°C and 160 mA onto polyvinylidene fluoride membranes (Millipore Corp., Bedford, Ma, USA). Nonspecific binding were blocked with 5% nonfat dry milk diluted in Tris-buffered saline with 0.05% of Tween-20 (TBS-T) for 2 hours at room temperature on a platform rocker. The blots were then incubated with a rabbit anti-MKRN3 antibody (1-1000, Sigma Aldrich- HPA029494) overnight, at 4°C with gentle shaking. Subsequently, blots were rinsed with TBS-T and incubated with anti-rabbit secondary antibody linked to horseradish peroxidase for 1 h and rinsed again in TBS-T. The antibody-antigen complexes were visualized an enhanced chemiluminescence reagent ( ) in a photodocumentator. Finally, for normalization purpose, blots were rinsed in a strip solution and reprobed with anti-beta actin antibody (1-10000, Sigma Aldrich-A3854). Molecular mass was approximated using a kaleidoscope 250 kd (Bio-rad-1610375) molecular weight ladder.

### *X-gal staining*

Testes were fixed in fresh 4% cold paraformaldehyde for 1 h at 4°C and then incubated three times, 30 min each, in rinse buffer [0.1 M sodium phosphate dibasic, 5mM sodium phosphate monobasic, 3mM MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O, 1.5 mM sodium deoxycholate, 3% octylphenoxypolyethoxyethanol (IGEPAL CA-630) ] at 4°C on a platform rocker. B- galactosidase activity was detected using a *LacZ* staining solution [1 mg/ml X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside), 5mM potassium ferricyanide, 5mM potassium ferrocyanide in rinse buffer] at 37°C overnight. After, the testes were embedded in paraffin (Harvard Medical School Rodent Pathology Core) and sectioned (7 µm). Sections were deparaffinized in xylene, hydrated in 100% and 70% ethanol and counterstained with 1% Saffronin.

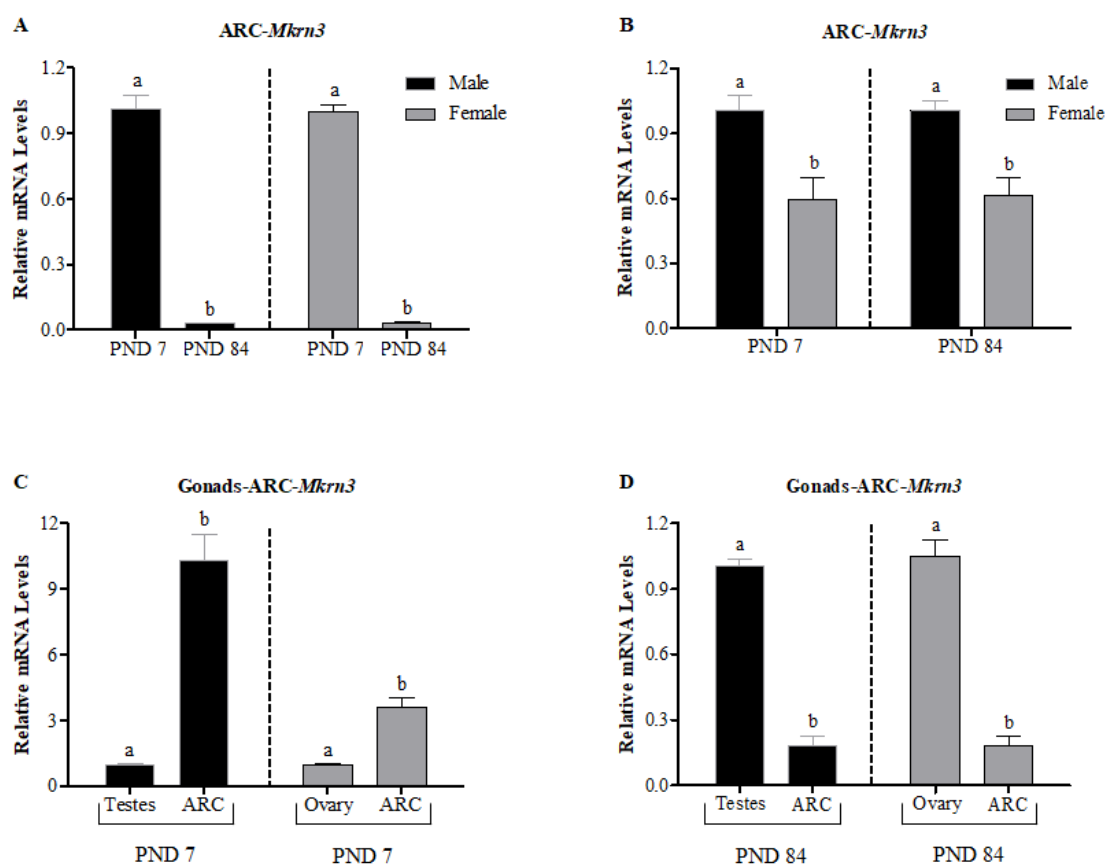
### *Statistical analysis*

Data were analyzed using the GraphPad Prism 5.0 statistical package. Analysis were performed using unpaired Student's t-test or oneway ANOVA followed by Tukey post hoc test for comparing the means of two or multiple groups, respectively. All data sets were presented as mean  $\pm$  SEM.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### *Mkfn3* expression pattern in the hypothalamus versus gonads

We initially validated our *Mkfn3* expression experiments by comparing prepubertal and adult expression patterns in the ARC of male and female mice, as previously described (Abreu et al., 2013). As expected, *Mkfn3* mRNA levels drastically reduced as the animals became sexually mature (Figure 1A). In addition, regardless the stage of sexual development, *Mkfn3* expression was higher in the ARC of males than females (Figure 1B). Next, we investigated temporal *Mkfn3* expression in the gonads compared with the ARC, both in prepubertal and in sexually mature mice. In prepubertal animals *Mkfn3* expression was higher in the ARC compared with the gonads, both in males and females; however, this pattern reversed in adult animals (Figure 1C and D).

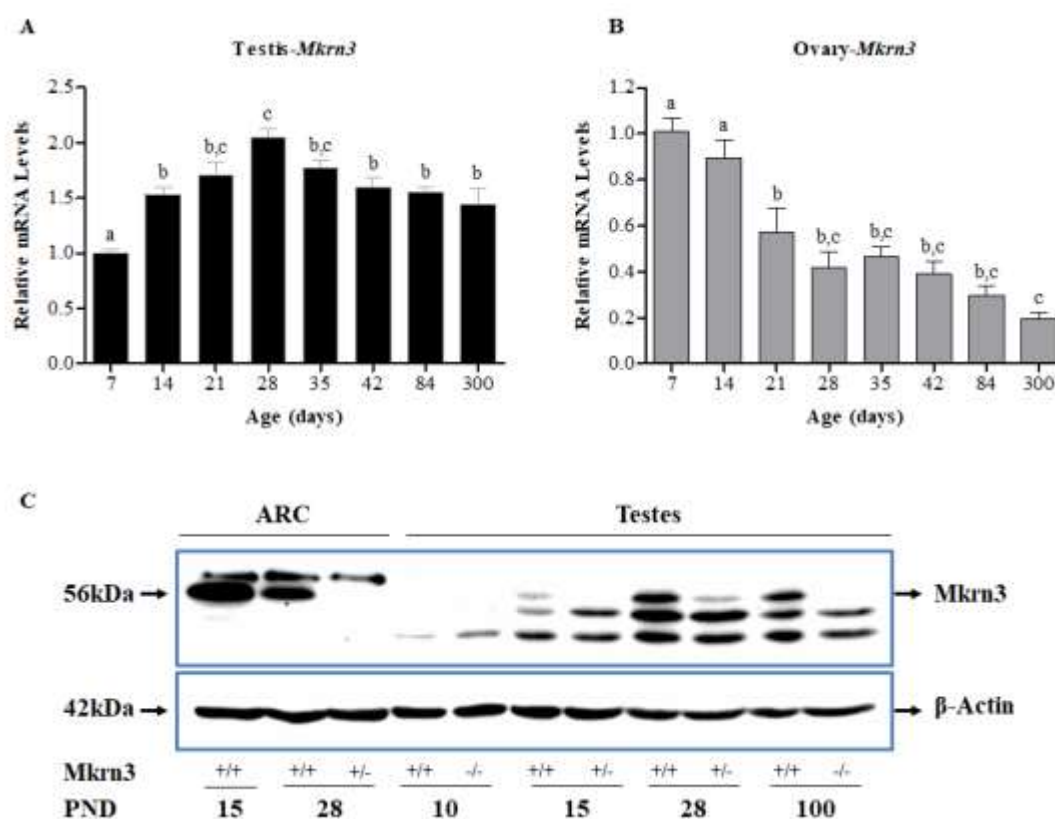


**Figure 1: *Mkfn3* expression pattern in the hypothalamus versus gonads across the development. A and B) *Mkfn3* expression in the prepubertal and adult ARC of males and females mice. C and D) *Mkfn3* expression pattern in the prepubertal and adult hypothalamus versus gonads of male and female mice. Data represent mean  $\pm$  SEM. Groups with different letters differ significantly from each other ( $P < 0.05$ ; Unpaired t test) ( $n=5$ /group).**

*Developmental mRNA expression and translation of Mkrn3 in the gonads*

We next examined the expression pattern of *Mkrn3* in the gonads of both male and female across different stages of postnatal development. Quantification by qPCR showed that *Mkrn3* mRNA levels was detected in testes and ovaries of wild-type mice at all ages evaluated, however, the pattern of *Mkrn3* expression across lifespan differed between male and female gonads. In the testes, we observed a significant increase in *Mkrn3* mRNA levels from PND14 to PND28 compared to PND7, which then remained relatively stable at those high levels until adulthood. In contrast, in the ovaries, *Mkrn3* mRNA levels were progressively lower from PND14 to PND28 compared to PND7, and then remained unchanged between PN35 and adulthood. Interestingly, *Mkrn3* expression was highest by PN28 to PN35 in the testes, whereas it reached the nadir at the same postnatal ages in the ovaries (Figure 2A and B).

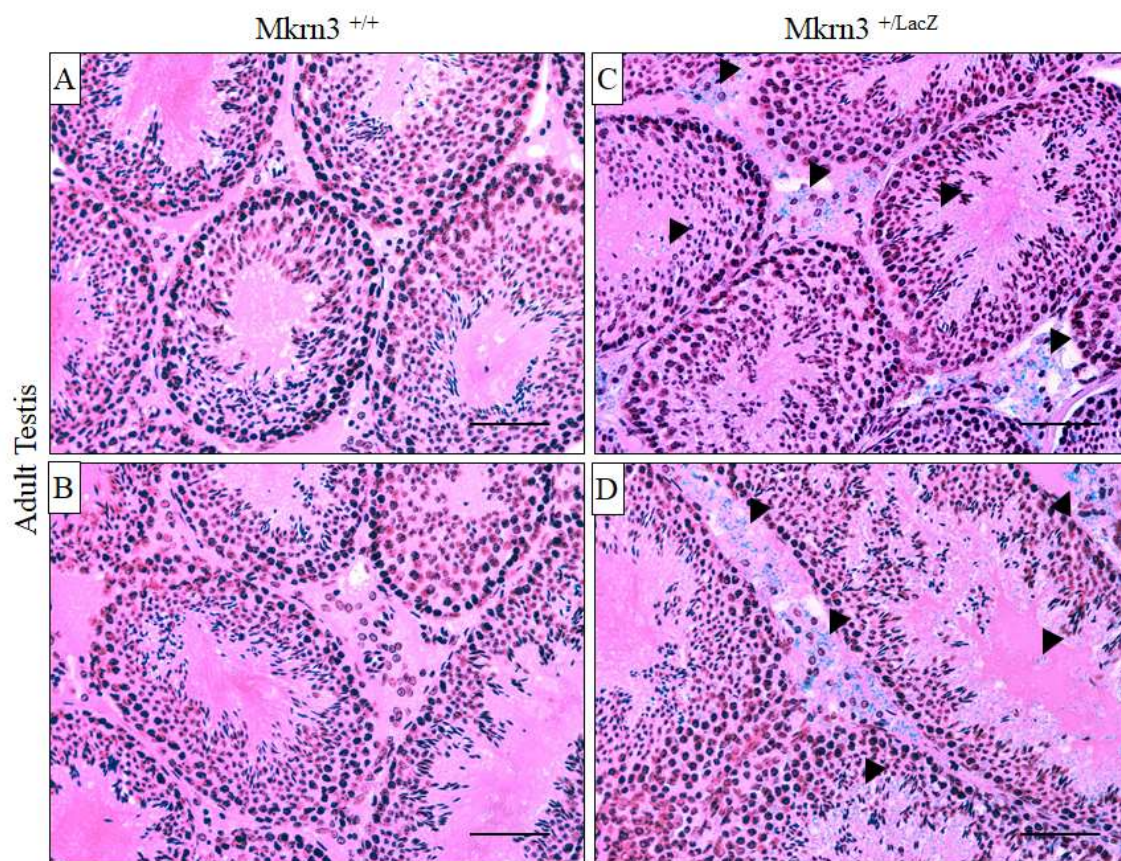
Interestingly, at the protein level, Mkrn3 expression was detected only in the testis, but not in the ovaries. Expression of Mkrn3 protein followed a similar developmental pattern to that of mRNA expression in the male gonad, with increased expression at puberty onset (PND28), then remaining high in adulthood. Of note, in contrast with the expected absence of Mkrn3 protein in the ARC of mice selectively deleted of the paternally inherited allele at PND28 (*Mkrn3*<sup>+/-</sup> knockout), testes from the same animals displayed some remaining expression of this protein, suggesting incomplete maternal allele imprinting in the male gonad, rather than the complete imprinting pattern observed in the ARC. Indeed, total ablation of Mkrn3 in the testis was observed only in the biallelic knockout mice (*Mkrn3*<sup>-/-</sup>), as seen at PND100. (Figure 2C).



**Figure 2: Comparative developmental Mkrn3 expression pattern in the mouse hypothalamic arcuate nucleus (ARC) and testes. A and B) Mkrn3 mRNA expression levels; C) Mkrn3 protein expression levels in the ARC and testes. Data represent mean  $\pm$  SEM. Groups with different letters differ significantly from each other ( $P < 0.05$ ; ANOVA/Tukey) ( $n=5$ /group). Mkrn3<sup>+/+</sup>, wild-type mice; Mkrn3<sup>+/-</sup>, paternally inherited allele knockout mice, and Mkrn3<sup>-/-</sup>, biallelic knockout mice.**

### *Mkrn3 spatial localization in testicular compartments*

Since we identified the Mkrn3 protein in the adult testis and not in the ovary, we next analyzed the anatomical distribution of the Mkrn3 in the different testicular cell populations. X-gal staining of testes' sections from adult Mkrn3-LacZ reporter mice showed that Mkrn3 is expressed mainly in the interstitial compartment, specifically in Leydig cells, but was also mildly detected in the seminiferous tubules (Figure 3).

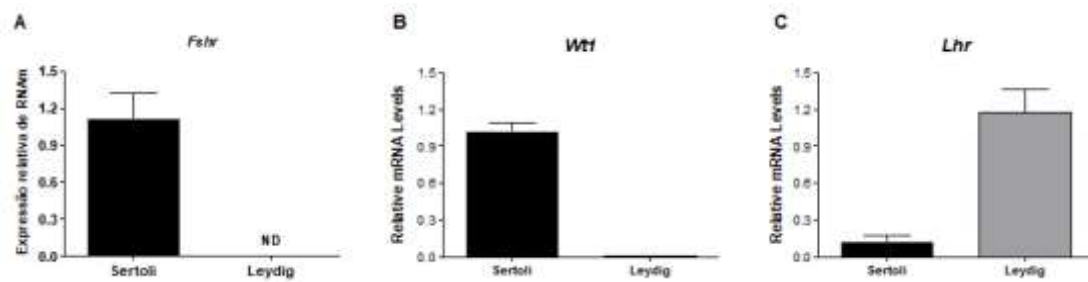


**Figure 3: Mkrn3 spatial localization in mice testis. A and B)** Wild-type testis (negative controls); **C and D)** Positive X-gal staining of testis sections of Mkrn3-LacZ reporter mice. Arrows represent the Mkrn3-LacZ staining in blue. Scale bars: 100 $\mu$ m

*In vitro studies: Differential regulation of Mkrn3 expression in testicular cells compartments by gonadotropins*

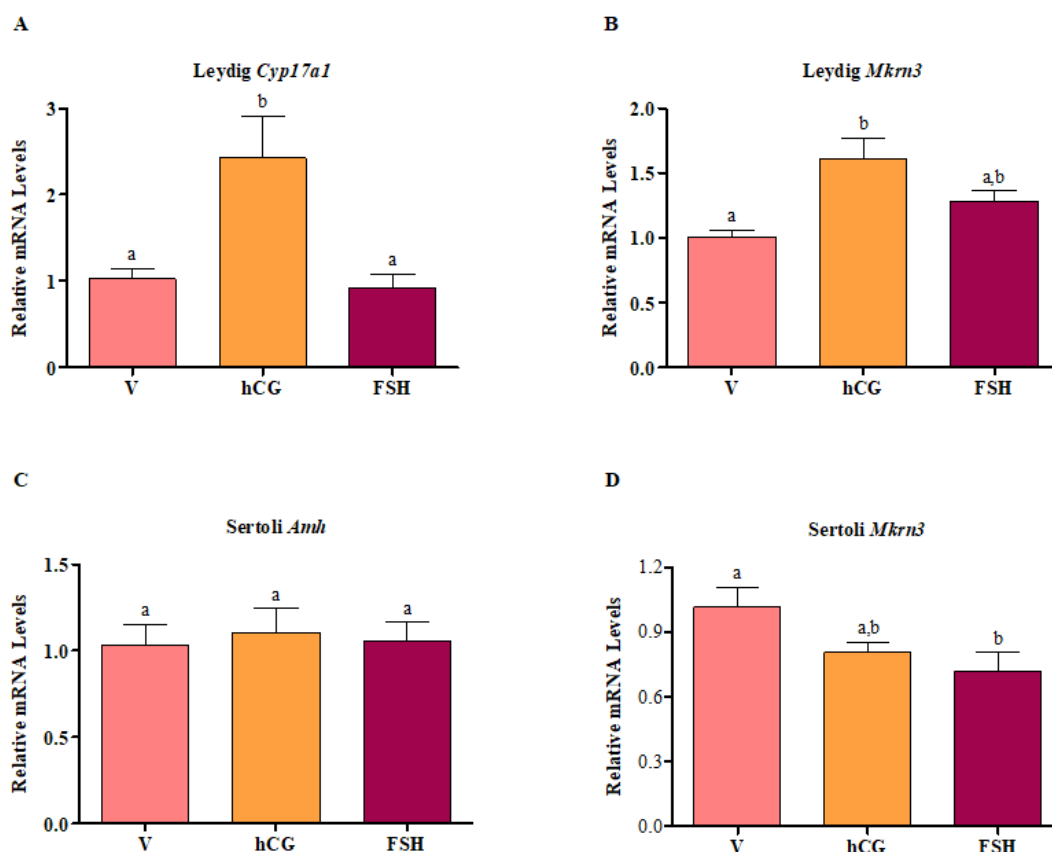
The observation of progressively increasing Mkrn3 mRNA and protein expression in the testis, from early postnatal stages to puberty initiation and sustained afterwards, together with protein expression pattern observed in the two functionally distinct testicular compartments, led us to hypothesize that Mkrn3 expression might be regulated by gonadotropins. To test this, we established Sertoli and Leydig primary culture cell lines from PND 35 mice. The purity of each cell line was determined by the expression of their specific genes: *Fshr* and *Wt1* for Sertoli and *Lhr* for Leydig cells (Supplemental figure 2).





**Supplemental Figure 2: Characterization of wild-type mice Sertoli and Leydig cells primary cultures.** The purity of each cell line was determined by the expression of their specific genes: **A)** *Fshr* and **B)** *Wt1* for Sertoli cells and **C)** *Lhr* for Leydig cells.

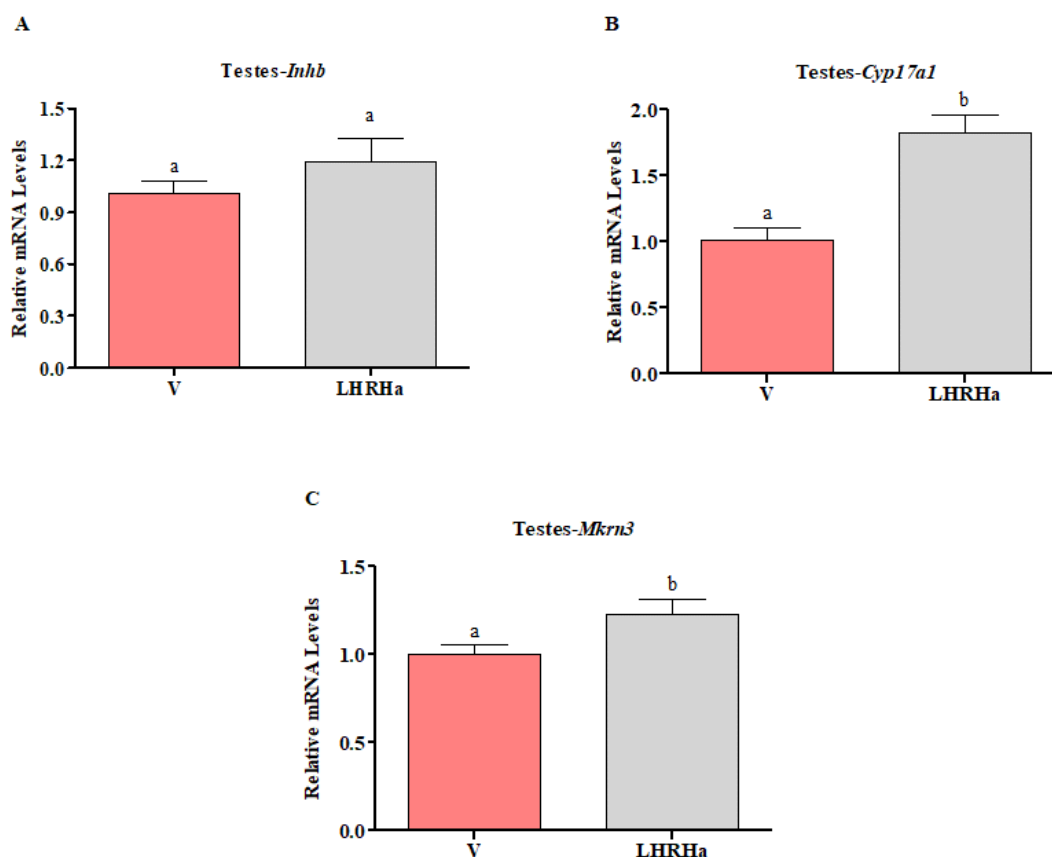
After the primary cell culture characterization, we treated the lineages with vehicle, hCG or FSH for 4 hours. As expected, we observed an increased *Cyp17a1* mRNA expression in Leydig cells induced by hCG treatment (Figure 4A). *Cyp17a1* encodes a steroidogenic enzyme (17-alpha hydroxylase) and thus serves as a positive control for hCG-induced Leydig cell stimulation. Interestingly, *Mkrr3* expression in the Leydig cells also increased in the hCG-treated samples, compared with vehicle (Figure 4B). In contrast, FSH treatment of Sertoli cells reduced the expression of *Mkrr3* mRNA (Figure 4D), although it did not change the expression of *Amh*, the positive control for FSH action (Figure 4C).



**Figure 4: Differential regulation of *Mkrn3* expression in testicular cells compartments (Leydig and Sertoli primary culture cells) by gonadotropins. . A and B) *Cyp17a1* and *Mkrn3* mRNA expression levels in Leydig cells treated with vehicle or hCG or FSH; C and D) *Amh* and *Mkrn3* mRNA expression levels in Sertoli cells treated with vehicle, hCG or FSH. Data represent mean  $\pm$  SEM. Groups with different letters differ significantly from each other ( $P < 0.05$ ; ANOVA/Tukey) (n=5/group).**

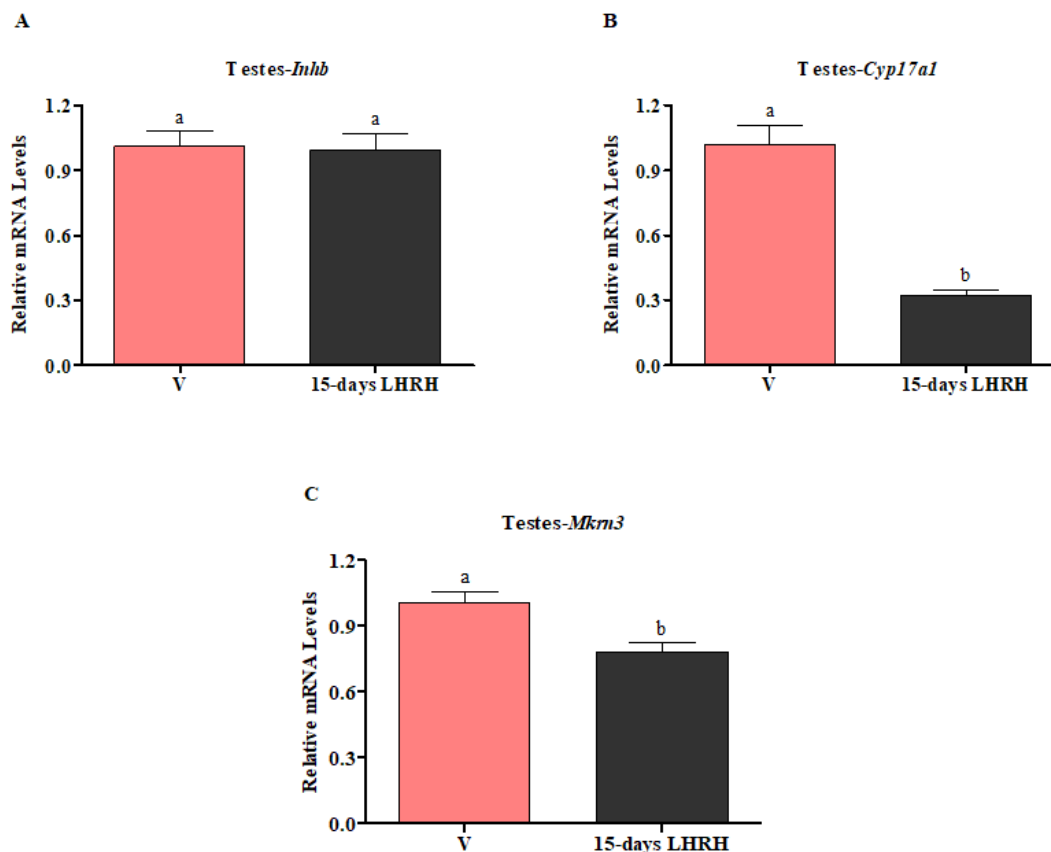
*In vivo studies: Regulation of *Mkrn3* expression in testicular compartments by gonadotrophins*

As shown before, our *in vitro* studies suggested a role for hCG and FSH in the regulation of *Mkrn3* expression in Leydig and Sertoli cells, respectively. To investigate whether the acute increase of these hormones *in vivo* would affect *Mkrn3* mRNA expression in the testis, we injected adult male mice with LHRH agonist or vehicle. Acute LHRH agonist treatment is expected to induce and increase the LH levels in the serum of the mice after 2 hours of treatment, while FSH levels would not significantly change. Consistent with the *in vitro* studies, we observed an increase in *Cyp17a1* and *Mkrn3* mRNA expression (Figure 5B and C) and no change in the *Inhb* mRNA levels (Figure 5A) in the whole testis of animals treated with LHRH agonist.



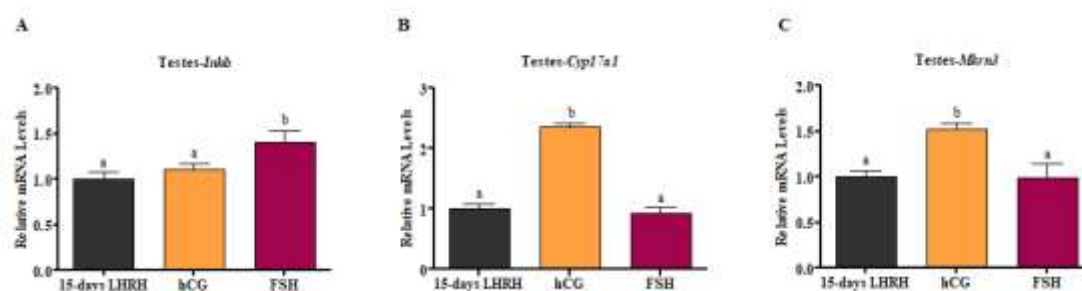
**Figure 5: Upregulation of *Mkrn3* expression in testicular compartments by acute administration of LHRH agonist.** mRNA levels expression of *Inhb* (A), *Cyp17a1* (B) and *Mkrn3* (C) in the testes of adult mice after acute administration of LHRH agonist. Data represent mean  $\pm$  SEM. Groups with different letters differ significantly from each other ( $P < 0.05$ ; Unpaired t test) (n=5/group).

Since the LHRH agonist-induced LH peak resulted in the increase of *Mkrn3* expression in the testis, we hypothesized that the suppression of this hormone would reverse it. To this end, another group of male mice were injected with LHRH agonist or vehicle daily for 15 days, in attempt to downregulate the HPG axis and consequently reduce serum LH and FSH levels in those animals. In the testis, *Inhb* expression, a FSH-dependent marker did not change after chronic LHRH agonist (Figure 6A). However, consistent with the findings on Leydig cells primary cultures, *Cyp17a1* and *Mkrn3* levels were suppressed (Figure 6B and C).



**Figure 6: Downregulation of *Mkrn3* expression in testicular compartments by chronic administration of LHRH agonist.** . mRNA levels expression of *Inhb* (A), *Cyp17a1* (B) and *Mkrn3* (C) in the testes of adult mice after chronic administration of LHRH agonist. Data represent mean  $\pm$  SEM. Groups with different letters differ significantly from each other ( $P < 0.05$ ; Unpaired t test) (n=5/group).

Given that *in vitro* and *in vivo* studies suggested that gonadotropins, mainly LH, have some effect on the expression of *Mkrn3* mRNA in the testis, we selectively tested hCG or FSH effects on *Mkrn3* and control gene expression markers after inducing downregulation of the HPG axis by chronic LHRH agonist treatment, as described above. We thus injected the HPG-blocked animals with an acute dose of vehicle or hCG or FSH. As expected, two hours later, *Cyp17a1* and *Mkrn3* levels increased following hCG injection, and *Inhb* increased after FSH stimulation. FSH, in turn, did not affect *Mkrn3* expression. (Figure 7).



**Figure 7: Upregulation of *Mkrn3* expression in testicular compartments by acute administration of hCG in HPG-blocked animals.** . mRNA levels expression of *Inhb* (A), *Cyp17a1* (B) and *Mkrn3* (C) in the testes of adult mice after acute administration of vehicle, hCH or FSH. Data represent mean  $\pm$  SEM. Groups with different letters differ significantly from each other ( $P < 0.05$ ; ANOVA/Tukey) (n=5/group).

## Discussion

Recently, several studies have shown that both gonads have the ability to synthesize neuropeptides. MKRN3 is another factor recently related with the right operation of the HPG axis. So far, studies in humans and mice support this protein as the main inhibitor of GnRH secretion during prepubertal years, and its loss of function is well established as the main cause of precocious puberty in humans. (Abreu et al., 2015). However, its mechanisms and exact functions are still unknown. In the present study, we comparatively investigated the behavior of *Mkrn3* expression in the hypothalamus *versus* male and female gonads. We also addressed the temporo-spatial expression pattern of this protein during sexual development, and whether it is regulated in the functional testicular compartments by gonadotropins.

Initially, we validated our *Mkrn3* expression data in the ARC by replicating those presented by Abreu and collaborators (Abreu et al., 2013) in which *Mkrn3* drastically reduced from pubertal onset to adulthood. In addition, we showed that, regardless the stage of sexual development, *Mkrn3* expression is higher in the ARC of males than in female. The reasons for this apparent discrepancy may not be straightforward, but might be related to sex-specific differences in the hypothalamic neuronal circuits and regulation lifelong (Navarro and Tena-Sempere, 2012).

Next, we evaluated the *Mkrn3* expression in the hypothalamus *versus* gonads and when *Mkrn3* appears at the gonadal level during sexual development. In the testis, differently from the mice hypothalamus, we showed

a progressive increase in *Mkrn3*/Mkrn3 expression after PND14, reaching a peak at PND28, which coincides with the onset of puberty and then remaining high lifelong. Although peculiar, this finding is in keeping with the previous descriptions of high *MKRN3* expression in the adult human testis (Jong et al., 1999). Interestingly, Anjum and collaborators (Anjum et al., 2012) have previously described increased expression of kisspeptin, Gnrh and Rfrp3 in the testis after puberty, which sustained along sexual maturity. Moreover, two other studies have shown that the levels of kisspeptin increases in the testis during puberty and remained elevated during reproductive age (Wang et al., 2014, Salehi et al., 2015).

Mkrn3 was localized in both testicular compartments, with the highest intensity in the steroidogenic Leydig cells. Neuropeptides, such as kisspeptin, Gnrh and Gnih have also been localized in the Leydig cells of mice testis (Anjum et al., 2012, Mei, et al., 2014, Salehi et al., 2015). Another study, Infan and collaborators (Irfan et al., 2016) immunolocalized kisspeptin in the Leydig cells and its receptor in the Sertoli cells of nonhumans primate testis. Despite the lack of functional evidence, altogether these data show up the possibility that hypothalamic neuropeptides and other factors regulating the activation of the reproductive axis, including Mkrn3, are specifically expressed in the different gonadal cell compartments and thus can potentially influence gonadal function across the development.

Accordingly, it is noteworthy that *Mkrn3*<sup>-/-</sup> knockout testes at PND28 have some preserved expression of Mkrn3 protein, differently from the ARC of the same animals, which displays complete ablation of Mkrn3 protein. This finding, as proposed by Jong and collaborators (Jong et al., 1999) suggests that *Mkrn3* is not completely maternally imprinted in the testis as it is in the hypothalamus. As is the case to all imprinted genes, Mkrn3 protein expression may vary depending on the imprinting pattern on a specific tissue and thereby on the proportion of “active” and “silenced” alleles. Therefore, it is conceivable that a tissue-specific regulated imprinting pattern may be possibly associated with Mkrn3 activity in the male gonad. This hypothesis is further supported by our findings of increased expression of Mkrn3 protein in the Leydig cell compartment, as well as the *in vitro* increased Mkrn3 mRNA expression in

Leydig cells after stimulation with LH, which was also corroborated *in vivo*, in whole testis.

In the ovaries, in turn, our results showed that the *Mkfn3* mRNA levels were generally lower than in the testes, though higher in early postnatal ages and then decreasing progressively through adulthood. However, the *Mkfn3* transduced expression in this tissue was undetectable in all ages analyzed, which lead us to believe that this factor is not translated and probably does not play a role in ovary function.

The observation of increased *Mkfn3* expression during puberty in the testis and the differential expression of this protein in the steroidogenic and gametogenic compartments led us to hypothesize that *Mkfn3* expression would be differentially responsive to gonadotropins. The studies conducted herein demonstrated that the *Mkfn3* mRNA levels increased in hCG-treated Leydig cells primary cultures. Moreover, the acute administration of LHRH agonist in adult wild-type mice increased *Mkfn3* expression in testes. Recent studies have also shown that hypothalamic neuropeptides, besides being expressed in the gonads, have their expression controlled by gonadotropins. Salehi and collaborators (Salehi et al., 2015) showed that primary Leydig culture cells showed increasing amounts of *Kiss1* mRNA and protein expression after LH stimulation. Moreover, in the same study, after acute injection of LHRH agonist in adult mice, increased testicular *StAR* and *Kiss1* expression was noted. Indeed, other differentially expressed regulatory proteins have been demonstrated under selective hCG or FSH stimulation. For example, the expression of *Lin28*, a RNA-binding protein involved in the control of microRNA synthesis, was rescued in both the Leydig and germ cells of hypogonadic *Gpr54* knockout mice after chronic hCG or FSH treatment, respectively. This further supports the idea that multiple gonadotropin-dependent factors may be involved in the final regulation of testicular compartments function and that a complementary communication between these cells is supposed (Gaytan et al., 2013).

Finally, the inhibition of the HPG axis with the use of LHRH agonist during 15 days in wild-type mice also corroborated that *Mkfn3* mRNA levels decreased after taking out the gonadotropins effects on the testis, consistent with the hCG-dependent increase describe above. Moreover, rescue of *Mkfn3*

expression was observed in the group that received hCG injection after completing the HPG downregulation phase, reinforcing that hCG selectively regulate *Mkln3* mRNA levels in Leydig cells, *in vivo*. Whether this is a direct effect of LH/hCG receptor mediated activation or secondary to the parallel increase in testosterone production in Leydig cells remains to be elucidated.

Taken together, our developmental expression analyses, *in vitro* and *in vivo* studies showed that *Mkln3* is produced in the testis, predominantly in the Leydig cells, and that its mRNA expression increases after puberty and is responsive to LH/hCG receptor activation. Additional studies are necessary to further address the functional consequences of these findings.



## References

ABREU, A. P. et al. A new pathway in the control of the initiation of puberty: the MKRN3 gene. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 54, n. 3, p. R131-R139, 2015.

ABREU, A. P. et al. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. **N Engl J Med**, v. 368, n. 26, p. 2467-75, Jun 27 2013.

ANJUM, S. et al. Localization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), kisspeptin and GnRH receptor and their possible roles in testicular activities from birth to senescence in mice. **J Exp Zool A Ecol Genet Physiol**, v. 317, n. 10, p. 630-44, Dec 2012.

GARCIA-ORTEGA, J. et al. Expression of neurokinin B/NK3 receptor and kisspeptin/KISS1 receptor in human granulosa cells. **Hum Reprod**, v. 29, n. 12, p. 2736-46, Dec 2014.

GAYTAN, F. et al. KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 3, p. E520-31, Mar 2009.

IRFAN, S. et al. Immunocytochemical localization of kisspeptin and kisspeptin receptor in the primate testis. **J Med Primatol**, v. 45, n. 3, p. 105-11, Jun 2016.

JONG, M. T. et al. A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region. **Hum Mol Genet**, v. 8, n. 5, p. 783-93, May 1999.

LIMA, C. J. et al. Mutational analysis of the genes encoding RFamide-related peptide-3, the human orthologue of gonadotrophin-inhibitory hormone, and its receptor (GPR147) in patients with gonadotrophin-releasing hormone-dependent pubertal disorders. **J Neuroendocrinol**, 2014;26(11):817-24.

LOFFLER, S. et al. Transcripts of neurokinin B and neurokinin 3 receptor in superovulated rat ovaries and increased number of corpora lutea as a non-specific effect of intraperitoneal agonist application. **Regul Pept**, 2004;122(2):131-137.

MEI, H. et al. Does Kisspeptin Signaling have a Role in the Testes? **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 4, p. 198, 2013.

NAVARRO, V. M.; TENA-SEMPERE, M. Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. **Nat Rev Endocrinol**, v. 8, n. 1, p. 40-53, Jan 2012.

SALEHI, S. et al. Developmental and endocrine regulation of kisspeptin expression in mouse Leydig cells. **Endocrinology**, v. 156, n. 4, p. 1514-22, Apr 2015.

TSUTSUI, K. et al. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 275, n. 2, p. 661-7, Aug 28 2000.

WANG, J. Y. et al. Kisspeptin expression in mouse Leydig cells correlates with age. **J Chin Med Assoc**, v. 78, n. 4, p. 249-57, Apr 2015.

ZHOU, Q. et al. High-fat diet decreases the expression of Kiss1 mRNA and kisspeptin in the ovary, and increases ovulatory dysfunction in postpubertal female rats. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 12, p. 127, 2014.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Em conjunto, análises de expressão durante o desenvolvimento e estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que:

- Independentemente do estágio de desenvolvimento sexual, a expressão de *Mkrn3* é maior no ARC de machos do que em fêmeas.

- A expressão de RNAm de *Mkrn3* é dimórfica entre as gônadas masculina e feminina ao longo do desenvolvimento pós natal, aumentando no início da puberdade e permanecendo alta na idade adulta nos testículos e diminuindo no mesmo período nos ovários.

- A proteína Mkrn3 foi traduzida e é expressa somente no testículo e não nos ovários.

- O Mkrn3 é localizado no interstício testicular, predominantemente nas células de Leydig, mas com menor expressão nos túbulos seminíferos.

- Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a expressão de RNAm de *Mkrn3* é responsiva à ativação do receptor LH/hCG.

Estudos adicionais são necessários para o entendimento das consequências funcionais dos achados supracitados, dentre eles estão sendo realizados:

a) avaliação hormonal das concentrações de LH e FSH no soro dos animais que participaram dos estudos *in vivo* realizados por esse trabalho;

b) investigar o efeito da ablação da proteína Mkrn3 sobre a expressão de genes importantes na função esteroidogênica testicular, como *Star*, *Cyp17a1* e *Cyp11a1*;

c) investigar os efeitos do tratamento com hCG na atividade transcricional do Mkrn3-luc através de transfecção seguida de ensaio de gene repórter.

## 5 REFERÊNCIAS

ABREU, A. P. et al. A new pathway in the control of the initiation of puberty: the MKRN3 gene. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 54, n. 3, p. R131-R139, 2015.

ABREU, A. P. et al. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. **N Engl J Med**, v. 368, n. 26, p. 2467-75, Jun 27 2013.

AGHAZADEH, Y. et al. Pharmacological regulation of the cholesterol transport machinery in steroidogenic cells of the testis. **Vitamins and Hormones**, 2015;98: 189–227.

ANJUM, S. et al. Localization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), kisspeptin and GnRH receptor and their possible roles in testicular activities from birth to senescence in mice. **J Exp Zool A Ecol Genet Physiol**, v. 317, n. 10, p. 630-44, Dec 2012.

AYCAN, Z. et al. Investigation of MKRN3 mutation in patients with familial Central precocious puberty. **J Clin Res Pediatr Endocrinol**, 2018;10(3):223-229.

BEATTIE, M.C. et al. Leydig cell aging and hypogonadism. **Experimental Gerontology**, 2015; 68:87–91.

BESSA, D. S. et al. High Frequency of MKRN3 Mutations in Male Central Precocious Puberty Previously Classified as Idiopathic. **Neuroendocrinology**, May 26 2016.

BOHNE, A. et al. The vertebrate makorin ubiquitin ligase gene family has been shaped by large-scale duplication and retroposition from an ancestral gonad-specific, maternal-effect gene. **BMC Genomics**, v. 11, p. 721, 2010.

BRITO, V. N. E LATRONICO, A.C. Underdiagnosis of central precocious puberty in boys with loss-of-function mutations of MKRN3. **J Pediatr**, 2017;183:202-203.

BUSCH, A. S. et al. Circulating MKRN3 Levels Decline During Puberty in Healthy Boys. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 101, n. 6, p. 2588-93, Jun 2016.

CASTELLANO, J. M. et al. Kisspeptins: bridging energy homeostasis and reproduction. **Brain Res**, v. 1364, p. 129-38, Dec 10 2010.

CHRISTOFORIDIS, A. et al. A novel MKRN3 nonsense mutation causing familial central precocious puberty. **Endocrine**, 2017;56(2):446-449.

CLARKSON, J. et al. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. **J Neurosci**, v. 28, n. 35, p. 8691-7, Aug 27 2008.

CLARKSON, J.; HERBISON, A. E. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5817-25, Dec 2006.

CORANDER, M. P. et al. The effects of neurokinin B upon gonadotrophin release in male rodents. **J Neuroendocrinol**, v. 22, n. 3, p. 181-7, Mar 2010.

D'ANGLEMONT DE TASSIGNY, X.; COLLEDGE, W. H. The role of kisspeptin signaling in reproduction. **Physiology (Bethesda)**, v. 25, n. 4, p. 207-17, Aug 2010.

DE ROUX, N. et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 19, p. 10972-6, Sep 16 2003.

DROR, T.; FRANKS, J.; KAUFFMAN, A. S. Analysis of multiple positive feedback paradigms demonstrates a complete absence of LH surges and GnRH activation in mice lacking kisspeptin signaling. **Biol Reprod**, v. 88, n. 6, p. 146, Jun 2013.

GARCIA-ORTEGA, J. et al. Expression of neurokinin B/NK3 receptor and kisspeptin/KISS1 receptor in human granulosa cells. **Hum Reprod**, v. 29, n. 12, p. 2736-46, Dec 2014.

GAYTAN, F. et al. KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 3, p. E520-31, Mar 2009.

GIANETTI, E. et al. TAC3/TACR3 mutations reveal preferential activation of gonadotropin-releasing hormone release by neurokinin B in neonatal life followed by reversal in adulthood. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 6, p. 2857-67, Jun 2010.

GRANDONE, A. et al. A case of familial central precocious puberty caused by a novel mutation in the makorin RING finger protein 3 gene. **BMC Endocr Disord**, v. 15, p. 60, 2015.

GRANDONE, A. et al. Molecular screening of MKRN3, DLK1, and KCNK9 genes in girls with idiopathic central precocious puberty. **Horm Res Paediatr**, 2017;88(3-4):194-200.

GRAY, T. A. et al. The ancient source of a distinct gene family encoding proteins featuring RING and C(3)H zinc-finger motifs with abundant expression in developing brain and nervous system. **Genomics**, v. 66, n. 1, p. 76-86, May 15 2000.

GURAN, T. et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to a novel missense mutation in the first extracellular loop of the neurokinin B receptor. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 10, p. 3633-9, Oct 2009.

HAGEN, C. P. et al. Circulating MKRN3 levels decline prior to pubertal onset and through puberty: a longitudinal study of healthy girls. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 100, n. 5, p. 1920-6, May 2015.

HERSHKO, A.; RAZIN, A.; SHEMER, R. Imprinted methylation and its effect on expression of the mouse Zfp127 gene. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 323-7, Jul 8 1999.

HOLSTEIN, A.F. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. **Reprod Biol Endocrinol**, 1:107, 2003.

HUHTANIEMI, I. A short evolutionary history of FSH-stimulated spermatogenesis. **Hormones (Athens)**, 2015;14:468-78.

IRFAN, S. et al. Immunocytochemical localization of kisspeptin and kisspeptin receptor in the primate testis. **J Med Primatol**, v. 45, n. 3, p. 105-11, Jun 2016.

JEONG, H.R. et al. Makorin ring finger 3 gene analysis in Koreans with familial precocious puberty. **J Pediatr Endocrinol Metab**, 2017;30(11):1197-1201.

JOHNSON, M. A.; TSUTSUI, K.; FRALEY, G. S. Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. **Horm Behav**, v. 51, n. 1, p. 171-80, Jan 2007.

JONG, M. T. et al. A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region. **Hum Mol Genet**, v. 8, n. 5, p. 783-93, May 1999.

KANSAKOSKI, J. et al. A missense mutation in MKRN3 in a Danish girl with central precocious puberty and her brother with early puberty. **Pediatr Res**, v. 78, n. 6, p. 709-11, Dec 2015.

KOTANI, M. et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. **J Biol Chem**, v. 276, n. 37, p. 34631-6, Sep 14 2001.

KRIEGSFELD, L. J. et al. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 7, p. 2410-5, Feb 14 2006.

LEDERMAN, M. A. et al. Age-related LH surge dysfunction correlates with reduced responsiveness of hypothalamic anteroventral periventricular nucleus kisspeptin neurons to estradiol positive feedback in middle-aged rats. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 1, p. 314-20, Jan 2010.

LEHMAN, M. N.; COOLEN, L. M.; GOODMAN, R. L. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. **Endocrinology**, v. 151, n. 8, p. 3479-89, Aug 2010.

LI, X. F. et al. Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p. e8334, 2009.

LOFFLER, S. et al. Transcripts of neurokinin B and neurokinin 3 receptor in superovulated rat ovaries and increased number of corpora lutea as a non-specific effect of intraperitoneal agonist application. **Regul Pept**, 2004;122(2):131-137.

MACEDO, D. et al. Central precocious puberty caused by a heterozygous deletion in the MKRN3 promoter region. **Neuroendocrinology**, 2018.

MEI, H. et al. Does Kisspeptin Signaling have a Role in the Testes? **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 4, p. 198, 2014.

MIDZAK, A. et al. Novel androstenediol interacts with the mitochondrial translocator protein and controls steroidogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, 2011; 286:9875–9887.

MITTELMAN-SMITH, M. A. et al. Arcuate kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons mediate the estrogen suppression of gonadotropin secretion and body weight. **Endocrinology**, v. 153, n. 6, p. 2800-12, Jun 2012.

MRUK, D.D. E CHENG, C. Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocr Rev**, 25:747-806, 2004.

MUIR, A. I. et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. **J Biol Chem**, v. 276, n. 31, p. 28969-75, Aug 3 2001.

NAVARRO, V. M. et al. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. **Endocrinology**, v. 145, n. 10, p. 4565-74, Oct 2004.

NAVARRO, V. M. et al. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. **J Neurosci**, v. 29, n. 38, p. 11859-66, Sep 23 2009.

NAVARRO, V. M.; TENA-SEMPERE, M. Neuroendocrine control by kisspeptins: role in metabolic regulation of fertility. **Nat Rev Endocrinol**, v. 8, n. 1, p. 40-53, Jan 2012.



NEOCLEOUS, V. et al. In silico analysis of a novel MKRN3 missense mutation in familial central precocious puberty. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 84, n. 1, p. 80-4, Jan 2016.

NISHIOKA, J. et al. The first Japanese case of central precocious puberty with a novel *MKRN3* mutation. **Hum Genome Var**, 2017;18;4:17017.

OHTAKI, T. et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. **Nature**, v. 411, n. 6837, p. 613-7, May 31 2001.

ORTIZ-CABRERA, N.V. et al. Clinical exome sequencing reveals MKRN3 pathogenic variants in familial and nonfamilial idiopathic central precocious puberty. **Horm Res Paediatr**, 2017;87(2):88-94.

PAYNE, A.H. E HALES, D.B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. **Endocrine Reviews**, 2004;25:947–970.

PETERSEN, C. E SODER, O. The sertoli cell a hormonal target and ‘super’ nurse for germ cells that determines testicular size. **Horm Res**, 66:153-161, 2006.

POLING, M. C.; KAUFFMAN, A. S. Regulation and Function of RFRP-3 (GnIH) Neurons during Postnatal Development. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 6, p. 150, 2015.

RANCE, N. E.; BRUCE, T. R. Neurokinin B gene expression is increased in the arcuate nucleus of ovariectomized rats. **Neuroendocrinology**, v. 60, n. 4, p. 337-45, Oct 1994.

ROA, J. et al. Opposite roles of estrogen receptor (ER)-alpha and ERbeta in the modulation of luteinizing hormone responses to kisspeptin in the female rat: implications for the generation of the preovulatory surge. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1627-37, Apr 2008.

ROA, J.; TENA-SEMPERE, M. Energy balance and puberty onset: emerging role of central mTOR signaling. **Trends Endocrinol Metab**, v. 21, n. 9, p. 519-28, Sep 2010.

ROBINSON, R. E FRITZ, I.B. Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. **Biol Reprod**, 24:1032-1041, 1981.

SALEHI, S. et al. Developmental and endocrine regulation of kisspeptin expression in mouse Leydig cells. **Endocrinology**, v. 156, n. 4, p. 1514-22, Apr 2015.

SANDOVAL-GUZMAN, T.; RANCE, N. E. Central injection of senktide, an NK3 receptor agonist, or neuropeptide Y inhibits LH secretion and induces different patterns of Fos expression in the rat hypothalamus. **Brain Res**, v. 1026, n. 2, p. 307-12, Nov 12 2004.

SHARPE, R.M. et al. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, 2003;125: 769-84.

SIMSEK, E. et al. Two frameshift mutations in MKRN3 in turkish patients with familial central precocious puberty. **Horm Res Paediatr**, 2017;87(6):405-411.

SKORDIS, N. et al. GnRH-dependent precocious puberty manifested at the age of 14 months in a girl with 47,XXX karyotype. **Hormones** (Athens), 2017;16(3):209-211.

SMITH, J. T. et al. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. **J Neurosci**, v. 26, n. 25, p. 6687-94, Jun 21 2006.

SMITH, J. T. et al. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. **Endocrinology**, v. 146, n. 9, p. 3686-92, Sep 2005.

STECCHINI, M. F. et al. Time Course of Central Precocious Puberty Development Caused by an MKRN3 Gene Mutation: A Prismatic Case. **Horm Res Paediatr**, Jul 16 2016.

TENA-SEMPERE, M. & HUHTANIEMI, I. in Reproductive medicine: molecular, cellular and genetic fundamentals 1st edn Ch. 12 (ed. Fauser, B. C. J. M.) 225–244 (Parthenon Publishing, New York, 2003).

TOPALOGLU, A. K. et al. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. **Nat Genet**, v. 41, n. 3, p. 354-8, Mar 2009.

TSUTSUI, K. et al. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 275, n. 2, p. 661-7, Aug 28 2000.

TSUTSUI, K. A new key neurohormone controlling reproduction, gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): Biosynthesis, mode of action and functional significance. **Prog Neurobiol**, v. 88, n. 1, p. 76-88, May 2009.

ULLAH, R. et al. Expression and actions of GnIH and its orthologs in vertebrates: Current status and advanced knowledge. **Neuropeptides**, May 24 2016.

VARIMO, T. et al. Circulating makorin ring finger protein 3 levels decline in boys before the clinical onset of puberty. **Eur J Endocrinol**, v. 174, n. 6, p. 785-90, Jun 2016.

WANG, J. Y. et al. Kisspeptin expression in mouse Leydig cells correlates with age. **J Chin Med Assoc**, v. 78, n. 4, p. 249-57, Apr 2015.

WANG, Y. et al. Steroidogenesis in Leydig cells: effects of aging and environmental factors. **Reproduction**, 2017;154(4):R111-R122.

YANO, T. et al. Developmental expression of RFamide-related peptides in the rat central nervous system. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 152, n. 2, p. 109-20, Sep 17 2004.

ZHOU, Q. et al. High-fat diet decreases the expression of Kiss1 mRNA and kisspeptin in the ovary, and increases ovulatory dysfunction in postpubertal female rats. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 12, p. 127, 2014.